

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092292** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.04.06

(51) Int. Cl. *A61K 45/00* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.26

(54) КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ ФИБРОЗА ГЛАЗ И/ИЛИ АНГИОГЕНЕЗА

(31) 1806918.7

(32) 2018.04.27

(33) GB

(86) PCT/EP2019/060772

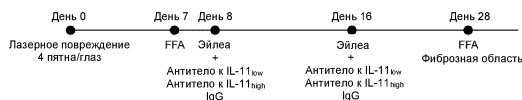
(87) WO 2019/207122 2019.10.31

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Кук Стюарт Александр, Шефер
Себастиан (SG)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены способы диагностики, лечения и профилактики фиброза и/или ангиогенеза, в частности, в глазу. Согласно конкретным вариантам реализации в способах применяют антагонистическое действие на опосредуемую IL-11 передачу сигнала и антагонистическое действие на ангиогенез. Также предложены комбинации, содержащие антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора.



202092292

A1

A1

202092292

КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ ФИБРОЗА ГЛАЗ И/ИЛИ АНГИОГЕНЕЗА

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно GB1806918.7, поданной 27 апреля 2018 г., содержание и элементы которой включены в настоящую заявку посредством ссылки для всех целей.

5 Область техники

Настоящее изобретение относится к диагностике, лечению и профилактике фиброза и/или ангиогенеза (в частности, в глазу) посредством антагонистического действия на опосредуемую IL-11 передачу сигнала и антагонистического действия на ангиогенез.

Уровень техники

10 Ангиогенез представляет собой важный процесс, который является ключевой частью процесса заживления ран. Патологический ангиогенез часто приводит к тяжелым состояниям и осложнениям; в основе критической потери зрения, которую вызывает большинство заболеваний, лежит патологический ангиогенез и заживление ран, часто в ответ на ишемию, воспаление или нарушение метаболизма тканей.

15 Антиангиогенные терапевтические средства, такие как терапевтические средства, направленные против VEGF, представляют собой растущую группу лекарственных средств, которые могут уменьшать образование новых сосудов под желтым пятном (макулой) сетчатки. Состояния, которые лечат этими агентами, включают возрастную дегенерацию желтого пятна, вызванные диабетом заболевания глаз и некоторые виды
20 рака.

Фиброз представляет собой важный процесс, который является существенной частью заживления ран. Избыточный фиброз часто встречается при многих редких и распространенных патологических состояниях и играет важную роль в патогенезе заболевания. Заболевания, характеризующиеся избыточным фиброзом, включают, но не
25 ограничиваются ими: системный склероз, склеродермию, гипертрофическую кардиомиопатию, дилатационную кардиомиопатию (ДКМП), фибрилляцию предсердий, фибрилляцию желудочков, миокардит, цирроз печени, заболевания почек, астму, заболевания глаза, муковисцидоз, артрит и идиопатический фиброз легких. Несмотря на большое влияние на здоровье человека, терапевтические и диагностические подходы к
30 лечению фиброза все еще остаются неудовлетворенной медицинской потребностью.

Краткое описание

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения фиброза у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества антагониста
35 опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложена комбинация антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора для применения в способе лечения или предотвращения фиброза.

5 Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к применению антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора в изготовлении лекарственного средства для применения в способе лечения или предотвращения фиброза.

Согласно любому из аспектов, раскрытых в настоящей заявке, фиброз предпочтительно представляет собой фиброз глаза.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз выбран из офтальмопатии Грейва, эпиретинального фиброза, ретинального фиброза, идиопатического премакулярного фиброза, субретинального фиброза (например, ассоциированного с отслойкой сетчатки или дегенерацией желтого пятна (например, влажной возрастной дегенерацией желтого пятна (AMD))), диабетической ретинопатии, 15 глаукомы, географической атрофии, фиброза роговицы, послеоперационного фиброза (например, задней капсулы после операции по удалению катаракты или фильтрационной подушки после трабекулэктомии при глаукоме), конъюнктивального фиброза или субконъюнктивального фиброза.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз 20 представляет собой ретинальный фиброз. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз представляет собой эпиретинальный фиброз. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз представляет собой субретинальный фиброз.

В некоторых вариантах реализации аспектов, раскрытых в настоящей заявке, фиброз 25 представляет собой фиброз сердца, фиброз печени или фиброз почки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз локализован в печени и ассоциирован с хроническим заболеванием печени или циррозом печени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз локализован в почке и ассоциирован с хроническим заболеванием почек. Согласно некоторым вариантам 30 реализации настоящего изобретения фиброз локализован в сердце и ассоциирован с дисфункцией мышечной ткани или электрических свойств сердца или утолщением стенок или клапанов сердца.

Согласно некоторым вариантам реализации аспектов, раскрытых в настоящей заявке, антагонист ангиогенного фактора представляет собой антагонист ангиогенного

фактора, выбранного из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ангиогенный фактор представляет собой VEGF. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения VEGF представляет собой один или более из VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C и/или VEGF-D. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения VEGF представляет собой VEGF-A.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с рецептором IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание комплекса IL-11:IL-11R α с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание комплекса *транс*-передачи сигнала IL-11:IL-11R α с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11R α с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с IL-11.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой антитело к IL-11 или антитело к IL-11R α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой рецептор-ловушку IL-11.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала способен уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения

антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с рецептором для ангиогенного фактора.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или рецептором для ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой антитело к ангиогенному фактору или антитело к рецептору ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой антитело к VEGF или антитело к рецептору VEGF. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку VEGF. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой афлиберцепт (SEQ ID NO:24).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора способен уменьшать экспрессию ангиогенного фактора или рецептора для ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.

Согласно некоторым вариантам реализации способов, комбинаций для применения или вариантов применения, описанных в настоящей заявке, указанный способ лечения

или предотвращения фиброза включает введение антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора субъекту, который, как было определено, имеет положительную регуляцию экспрессии IL-11 или рецептора IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения определено наличие

5 положительной регуляции экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора.

Согласно некоторым вариантам реализации способов, комбинаций для применения или вариантов применения, описанных в настоящей заявке, указанный способ лечения или предотвращения включает определение наличия положительной регуляции

10 экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 у субъекта и введение антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора субъекту с положительной регуляцией экспрессии IL-11 или рецептора IL-11.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ определения пригодности субъекта для лечения или предотвращения фиброза с применением

15 антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*, наличия положительной регуляции экспрессии интерлейкина 11 (IL-11), рецептора интерлейкина 11 (IL-11R), ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации

20 настоящего изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*, наличия положительной регуляции экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ отбора субъекта для лечения или предотвращения фиброза с применением антагониста

25 опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*, наличия положительной регуляции экспрессии интерлейкина 11 (IL-11), рецептора интерлейкина 11 (IL-11R), ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

30 изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*, наличия положительной регуляции экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора у субъекта.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ диагностики фиброза или риска развития фиброза у субъекта. Согласно некоторым вариантам

35 реализации настоящего изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*,

наличия положительной регуляции интерлейкина 11 (IL-11), рецептора интерлейкина 11 (IL-11R), ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора в образце, полученном от субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*, наличия

5 положительной регуляции экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора у субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает отбор субъекта для лечения с применением антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ обеспечения

10 прогноза для субъекта, который имеет или который предположительно имеет фиброз, и, на основании определения, обеспечение прогноза для лечения субъекта с применением антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает определение, необязательно *in vitro*, наличия положительной регуляции экспрессии

15 интерлейкина 11 (IL-11), рецептора интерлейкина 11 (IL-11R), ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора в образце, полученном от субъекта. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает отбор субъекта, который, как определено, имеет положительную регуляцию экспрессии интерлейкина 11 (IL-11), рецептора интерлейкина 11 (IL-11R), ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного

20 фактора, для лечения с применением антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложен способ диагностики фиброза или риска развития фиброза у субъекта, причем указанный способ включает определение, необязательно *in vitro*, одного или более генетических факторов у

25 субъекта и отбор субъекта для лечения с применением антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более генетических факторов позволяют прогнозировать положительную регуляцию экспрессии интерлейкина 11 (IL-11) или рецептора интерлейкина 11 (IL-11R) или положительную регуляцию активности IL-11 или

30 IL-11R. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более генетических факторов позволяют прогнозировать положительную регуляцию экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора или положительную регуляцию активности ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

35 изобретения один или более генетических факторов позволяют прогнозировать

положительную регуляцию экспрессии ангиогенного фактора или экспрессии рецептора ангиогенного фактора или положительную регуляцию активности ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой антитело к IL-11, а антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку VEGF. Согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения рецептор-ловушка VEGF представляет собой афлиберцепт.

Также предложена комбинация, содержащая антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора. Также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора. Также предложен набор компонентов, содержащий заранее определенное количество антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора, комбинации, описанной в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ангиогенный фактор выбран из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с рецептором IL-11, при этом необязательно указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11, например, описанный в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала способен уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11 и представляет собой, например, агент, описанный в настоящей заявке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора. Антагонист ангиогенного фактора может представлять собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, например, описанный в настоящей заявке. Антагонист ангиогенного фактора может представлять собой афлиберцепт. Антагонист ангиогенного фактора может быть способен уменьшать экспрессию партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, например антагонист, описанный в настоящей заявке.

Описание

Настоящее изобретение основано на неожиданном открытии того, что комбинированная терапия антагонистом ангиогенного фактора и антагонистом опосредуемой IL-11 передачи сигнала обеспечивает превосходные терапевтические эффекты в лечении фиброза и, в частности, фиброза в глазу. Кроме того, в настоящей заявке показаны неожиданные данные о том, что антагонисты опосредуемой IL-11 передачи сигнала можно применять для лечения фиброза в глазу и что антагонистическое действие на опосредуемую IL-11 передачу сигнала может улучшить эффективность антагонистического действия на ангиогенез в комбинированном лечении. Данные также показывают неожиданный лечебный эффект антагонистического действия на опосредуемую IL-11 передачу сигнала при хориоидальной неоваскуляризации (CNV).

Интерлейкин 11 и рецепторы IL-11

Интерлейкин 11 (IL-11), также известный как фактор ингибирования адипогенеза, представляет собой плейотропный цитокин и является представителем семейства цитокинов IL-6, которое включает IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, онкостатин, фактор ингибирования лейкоза (LIF), кардиотропин-1 (CT-1), кардиотропиноподобный цитокин (CLC), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) и нейропоэтин (NP-1).

Интерлейкин 11 (IL-11) экспрессируется в различных типах мезенхимальных клеток¹. Геномные последовательности IL-11 были картированы на хромосоме 19 и центромерной области хромосомы 7¹, также он транскрибируется с каноническим сигнальным пептидом, который обеспечивает эффективную секрецию из клеток. Комплекс активирующего белка IL-11, cJun/AP-1, расположенный в его промоторной последовательности, имеет решающее значение для исходной транскрипционной регуляции IL-11¹. Незрелая форма IL-11 человека представляет собой полипептид из 199 аминокислот, в то время как зрелая форма IL-11 кодирует белок из 178 аминокислотных остатков (Garbers and Scheller, Biol. Chem. 2013; 394(9):1145-1161). Аминокислотная последовательность IL-11 человека доступна под номером доступа UniProt P20809 (P20809.1 GI:124294; SEQ ID NO:1). Рекомбинантный IL-11 человека (опрелвекин) также доступен коммерчески. IL-11 из других видов, включая мышь, крысу, свинью, корову, несколько видов костистых рыб и приматов, также были клонированы и секвенированы.

В данном описании «IL-11» относится к IL-11 из любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 из любого вида. Согласно предпочтительным вариантам реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*). Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 необязательно могут характеризоваться, как имеющие по меньшей мере 70%, предпочтительно одно из 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью незрелого или зрелого IL-11 из конкретного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11 необязательно могут характеризоваться способностью связывать IL-11R α (предпочтительно из того же вида) и стимулировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих IL-11R α и gp130 (например, как описано в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11); или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Фрагмент IL-11 может быть любой длины (по количеству аминокислот), но необязательно может быть по меньшей мере 25% от длины зрелого IL-11 и может иметь максимальную длину, такую как одно из 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины зрелого IL-11. Фрагмент IL-11 может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину, такую как одно из 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 195 аминокислот.

IL-11 передает сигнал посредством гомодимера повсеместно экспрессируемого гликопротеина 130 (gp130; также известного как гликопротеин 130, IL-6ST, IL-6-бета или CD130). Gp130 представляет собой трансмембранный белок, который образует общую субъединицу рецептора цитокинов типа I с семейством рецепторов IL-6. Специфичность достигается за счет индивидуальной альфа-субъединицы рецептора интерлейкина 11 (IL-11R α), которая не принимает непосредственного участия в передаче сигнала, несмотря на то, что первоначальное событие связывания цитокина с α -рецептором приводит к образованию конечного комплекса с gp130.

Gp130 человека (включая сигнальный пептид из 22 аминокислот) представляет собой белок из 918 аминокислот, а зрелая форма состоит из 866 аминокислот, включая внеклеточный домен из 597 аминокислот, трансмембранный домен из 22 аминокислот и внутриклеточный домен из 277 аминокислот. Внеклеточный домен белка содержит модуль связывания цитокинов (CBM) gp130. CBM gp130 содержит Ig-подобный домен D1 и фибронектиновые домены D2 и D3 типа III gp130. Аминокислотная последовательность gp130 человека доступна под номером доступа UniProt P40189-1 (SEQ ID NO:2).

IL-11R α человека представляет собой полипептид из 422 аминокислот (UniProt Q14626; SEQ ID NO:3) и имеет ~85% идентичность нуклеотидной последовательности и аминокислотной последовательности с IL-11R α мыши (Du and Williams., Blood Vol, 89, No,11, June 1, 1997). Сообщалось о двух изоформах IL-11R α , которые различаются цитоплазматическим доменом (Du and Williams, см. выше). α -цепь рецептора IL-11 (IL-11R α) имеет много структурных и функциональных сходств с α -цепью рецептора IL-6 (IL-6R α). Внеклеточный домен имеет 24% идентичность аминокислотной

последовательности, включая характерный консервативный мотив Trp-Ser-X-Trp-Ser (WSXWS). В коротком цитоплазматическом домене (34 аминокислоты) отсутствуют области Box 1 и 2, которые необходимы для активации пути передачи сигнала JAK/STAT.

Были картированы сайты связывания рецептора на IL-11 мыши, и идентифицированы три сайта – сайты I, II и III. Связывание с gp130 уменьшается за счет замен в области сайта II и замен в области сайта III. Мутанты сайта III не проявляют обнаруживаемую агонистическую активность и обладают антагонистической активностью в отношении IL-11Ra (Cytokine Inhibitors, гл. 8; под ред. Gennaro Ciliberto и Rocco Savino, Marcel Dekker, Inc. 2001).

В данном описании рецептор IL-11/рецептор IL-11 (IL-11R) относится к полипептиду или полипептидному комплексу, способному связывать IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор IL-11 способен связывать IL-11 и индуцировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор.

Рецептор IL-11 может происходить из любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи рецептора IL-11 из любого вида. Согласно предпочтительным вариантам реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор IL-11 (IL-11R) может представлять собой IL-11Ra. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор IL-11 может представлять собой полипептидный комплекс, содержащий IL-11Ra. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор IL-11 может представлять собой полипептидный комплекс, содержащий IL-11Ra и gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор IL-11 может представлять собой gp130 или комплекс, содержащий gp130, с которым связывается IL-11.

Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11Ra необязательно могут характеризоваться, как имеющие по меньшей мере 70%, предпочтительно одно из 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью IL-11Ra из конкретного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи IL-11Ra необязательно могут характеризоваться способностью связывать IL-11 (предпочтительно из того же вида) и стимулировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих IL-11Ra и gp130 (например, как описано в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) или Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80). Фрагмент рецептора IL-11 может быть любой длины (по количеству аминокислот), но необязательно может быть по

меньшей мере 25% от длины зрелого IL-11R α и может иметь максимальную длину, такую как одно из 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины зрелого IL-11R α . Фрагмент фрагмента рецептора IL-11 может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину, такую как одно из 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400 или 415 аминокислот.

Передача сигнала IL-11

IL-11 связывается с IL-11R α с низкой аффинностью ($K_d \sim 10$ нмоль/л), а взаимодействия между этими партнерами по связыванию по отдельности недостаточно для передачи биологического сигнала. Получение рецептора с высокой аффинностью ($K_d \sim 400-800$ пмоль/л), способного передавать сигнал, требует совместной экспрессии IL-11R α и gp130 (Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12; Hilton et al., EMBO J 13:4765, 1994; Nandurkar et al., Oncogene 12:585, 1996). Связывание IL-11 с IL-11R α на клеточной поверхности индуцирует гетеродимеризацию, фосфорилирование тирозина, активацию gp130 и последующую передачу сигнала, преимущественно посредством каскада митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и пути Janus-киназы/сигнального трансдуктора и активатора транскрипции (Jak/STAT) (Garbers and Scheller, см. выше).

В целом, растворимый IL-11R α также может образовывать биологически активные растворимые комплексы с IL-11 (Pflanz et al., 1999 FEBS Lett, 450, 117-122), это повышает вероятность того, что, сходно с IL-6, в некоторых случаях IL-11 может связывать растворимый IL-11R α до связывания gp130 на клеточной поверхности (Garbers and Scheller, см. выше). Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12) описывают экспрессию альфа-цепи растворимого рецептора IL-11 мыши (sIL-11R) и исследовали передачу сигнала в клетках, экспрессирующих gp130. В присутствии gp130, но не трансмембранного IL-11R, sIL-11R опосредовал зависимую от IL-11 дифференцировку лейкозных клеток M1 и пролиферацию в клетках Ba/F3 и ранние внутриклеточные события, включая фосфорилирование gp130, STAT3 и SHP2, сходно с передачей сигнала посредством трансмембранного IL-11R. Недавно была продемонстрирована активация передачи сигнала посредством связанного с клеточной мембраной gp130 под действием IL-11, связанного с растворимым IL-11R α (Lokau et al., 2016 Cell Reports 14, 1761–1773). Эта так называемая *транс*-передача сигнала IL-11 может быть очень важным компонентом опосредуемой IL-11 передачи сигнала и даже может быть наиболее распространенной формой опосредуемой IL-11 передачи сигнала, поскольку, несмотря на то, что экспрессия IL-11R α ограничена относительно небольшой подгруппой типов клеток, gp130 экспрессируется на целом ряде типов клеток.

В настоящей заявке «*транс*-передача сигнала IL-11» используется для обозначения передачи сигнала, которая запускается в результате связывания IL-11, связанного с IL-11R α , с gp130. IL-11 может быть связан с IL-11R α в виде нековалентного комплекса. gp130 связан с мембраной и экспрессируется клеткой, в которой происходит передача сигнала после связывания комплекса IL-11:IL-11R α с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения IL-11R α может представлять собой растворимый IL-11R α . Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растворимый IL-11R α представляет собой растворимую (секретируемую) изоформу IL-11R α (например, в которой отсутствует трансмембранный домен). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растворимый IL-11R α представляет собой высвобожденный продукт протеолитического отщепления внеклеточного домена IL-11R α , связанного с клеточной мембраной. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения IL-11R α может быть связан с клеточной мембраной, а передача сигнала посредством gp130 может быть запущена в результате связывания IL-11, связанного с IL-11R α , который связан с клеточной мембраной, это так называемая «*цис*-передача сигнала IL-11».

Было показано, что опосредуемая IL-11 передача сигнала стимулирует кроветворение и тромбопоэз, стимулирует активность остеокластов, стимулирует нейрогенез, ингибирует адипогенез, уменьшает экспрессию провоспалительных цитокинов, модулирует метаболизм внеклеточного матрикса (ВКМ) и опосредует контроль нормального размножения эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта¹.

Физиологическая роль интерлейкина 11 (IL-11) остается неясной. IL-11 наиболее сильно связан с активацией кроветворных клеток и выработкой тромбоцитов, но также предполагалось, что он обладает провоспалительным, а также противовоспалительным, проангиогенным и важным для неоплазии действием. Известно, что TGF β 1 или повреждение тканей могут индуцировать экспрессию IL-11 (Zhu, M. et al. PLOS ONE 10, (2015); Yashiro, R. et al. J. Clin. Periodontol. 33, 165–71 (2006); Obana, M. et al. Circulation 121, 684–91 (2010); Tang, W et al. J. Biol. Chem. 273, 5506–13 (1998)).

IL-11 является важным посттранскрипционным модулятором опосредуемой TGF β передачи сигнала. Было показано, что TGF β 1 стимулирует промоторную область AP-1 IL-11, и было показано, что TGF β -индуцированная секреция IL-11 индуцирует активацию киназ ERK p42/44 и MAP p38 в кишечных миофибробластах (Bamba et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. (2003)(285(3):G529-38). Ингибиторы MAP-киназы способны значительно уменьшать TGF β -индуцированную секрецию IL-11, и было показано, что

опосредуемая MAP-киназой p38 стабилизация иРНК имеет решающее значение для TGFβ-индуцированной секреции IL-11.

В настоящей заявке «передача сигнала IL-11» и «опосредуемая IL-11 передача сигнала» относится к передаче сигнала, опосредуемой связыванием IL-11 или его
5 фрагмента, обладающего функцией зрелой молекулы IL-11, с рецептором IL-11.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала или способные ингибировать опосредуемую ангиогенным фактором передачу сигнала, представляют
10 собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты.

В настоящей заявке «антитело» используется в самом широком смысле и включает моноклональные антитела, поликлональные антитела, моноспецифичные и полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и фрагменты антител, при условии, что они проявляют связывание с соответствующей молекулой-мишенью.

Принимая во внимание современные методики, относящиеся к технологии
15 моноклональных антител, антитела могут быть получены к большинству антигенов. Антигенсвязывающая часть может представлять собой часть антитела (например, фрагмент Fab) или синтетический фрагмент антитела (например, одноцепочечный фрагмент Fv [ScFv]). Моноклональные антитела к выбранным антигенам могут быть
20 получены с помощью известных методик, например, тех, которые раскрыты в «Monoclonal Antibodies: A manual of techniques», H Zola (CRC Press, 1988) и в «Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications», J G R Hurrell (CRC Press, 1982). Химерные антитела обсуждаются Neuberger et al (1988, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799). Моноклональные антитела (MAT) являются особенно
25 подходящими в способах согласно настоящему изобретению и представляют собой гомогенную популяцию антител, специфично нацеленных на отдельный эпитоп на антигене.

Поликлональные антитела также можно применять в способах согласно настоящему изобретению. Предпочтительными являются моноспецифичные поликлональные
30 антитела. Подходящие поликлональные антитела могут быть получены с использованием способов, хорошо известных в данной области техники.

Также могут быть применены/обеспечены антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как фрагменты Fab и Fab₂, а также генетически модифицированные антитела и фрагменты антител. Вариабельный тяжелый (V_H) и вариабельный легкий (V_L) домены
35 антитела участвуют в распознавании антигена, этот факт впервые был установлен в

ранних экспериментах с расщеплением протеазами. Дополнительное подтверждение было обнаружено путем «гуманизации» антител грызунов. Вариабельные домены, происходящие из организма грызунов, могут быть гибридизованы с константными доменами, происходящими из организма человека, так, что полученное антитело сохраняет антигенную специфичность исходного антитела грызуна (Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851-6855).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением содержат области, определяющие комплементарность (CDR), антитела, которое способно связываться с соответствующей молекулой-мишенью, т. е. IL-11, комплексом, содержащим IL-11, рецептором IL-11, ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора.

Антитела обычно содержат шесть CDR; три в вариабельной области легкой цепи (VL): LC-CDR1, LC-CDR2, LC-CDR3, и три в вариабельной области тяжелой цепи (VH): HC-CDR1, HC-CDR2 и HC-CDR3. Шесть CDR вместе определяют паратоп антитела, который является частью антитела, которая связывается с молекулой-мишенью. Существует несколько различных правил определения CDR антител, таких как те, которые описаны в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 изд. Служба общественного здравоохранения США, Национальные институты здравоохранения, Бетесда, Мэриленд (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), и VBASE2, как описано в Retter et al., Nucl. Acids Res. (2005) 33 (suppl 1): D671-D674.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты в соответствии с настоящим изобретением могут быть сконструированы и получены с использованием последовательностей моноклональных антител (МАТ), способных связываться с соответствующей молекулой-мишенью. Также могут быть применены/обеспечены антигенсвязывающие области антител, такие как одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), фрагменты Fab и Fab₂. «Антигенсвязывающая область» представляет собой любой фрагмент антитела, который способен связываться с мишенью, в отношении которой данное антитело является специфичным.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела/фрагменты содержат области VL и VH антитела, которое способно связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора. Области VL и VH антигенсвязывающей области антитела вместе составляют область Fv. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела/фрагменты содержат или состоят из области Fv антитела, которое способно связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный

фактор, или рецептором для ангиогенного фактора. Область Fv может быть экспрессирована в виде одной цепи, в которой области VH и VL связаны ковалентно, например, с помощью гибкого олигопептида. Соответственно, антитела/фрагменты могут содержать или состоять из scFv, содержащего области VL и VH антитела, которое
5 способно связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора.

VL и константная область легкой цепи (CL), а также область VH и константная область 1 тяжелой цепи (CH1) антигенсвязывающей области антитела вместе составляют область Fab. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения
10 антитела/фрагменты содержат или состоят из области Fab антитела, которое способно связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела/фрагменты содержат или состоят из целого антитела, способного связываться с
15 ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора. «Целое антитело» относится к антителу, имеющему структуру, которая по существу сходна со структурой иммуноглобулина (Ig). Различные виды иммуноглобулинов и их структуры описаны, например, в Schroeder and Cavacini J Allergy Clin Immunol. (2010) 125(202): S41-S52, которая тем самым полностью включена
20 посредством ссылки. Иммуноглобулины типа G (т. е. IgG) представляют собой гликопротеины массой ~150 кДа, содержащие две тяжелые цепи и две легкие цепи. От N-конца к C-концу, тяжелые цепи содержат VH, за которой следует константная область тяжелой цепи, содержащая три константных домена (CH1, CH2 и CH3), и, аналогичным образом, легкая цепь содержит VL, за которой следует CL. В зависимости от тяжелой
25 цепи иммуноглобулины могут быть классифицированы на IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgA (например, IgA1, IgA2), IgD, IgE или IgM. Легкая цепь может быть каппа (κ) или лямбда (λ).

Фрагменты антител Fab, Fv, ScFv и dAb все могут экспрессироваться в *E. coli* и секретироваться из нее, что позволяет легко продуцировать большие количества
30 указанных фрагментов.

Целые антитела и фрагменты F(ab')₂ являются «двухвалентными». Под «двухвалентным» мы подразумеваем, что указанные антитела и фрагменты F(ab')₂ имеют два антигенсвязывающих сайта. Напротив, фрагменты Fab, Fv, ScFv и dAb являются
одновалентными и имеют только один антигенсвязывающий сайт. Синтетические
35 антитела, способные связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим

ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора, также могут быть получены с использованием технологии фагового дисплея, которая хорошо известна в данной области техники.

Антитела могут быть получены с помощью способа созревания аффинности, в котором получают модифицированное антитело, которое имеет улучшенную аффинность антитела в отношении антигена по сравнению с немодифицированным исходным антителом. Антитела с созревшей аффинностью могут быть получены с помощью процедур, известных в данной области техники, например, Marks *et al.*, *Rio/Technology* 10:779-783 (1992); Barbas *et al.* *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al.* *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al.* *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al.*, *J. Immunol.* 154(7):331 0-15 9 (1995); и Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Антитела/фрагменты включают полиспецифичные (например, биспецифичные) антитела, например, состоящие из фрагментов двух или более разных антител, так, что полиспецифичное антитело связывает два или более типов антигена. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное антитело содержит антитело/фрагмент, описанные в настоящей заявке, способные связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора, IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения биспецифичное антитело содержит (i) антитело/фрагмент, описанные в настоящей заявке, способные связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, и (ii) антитело/фрагмент, описанные в настоящей заявке, способные связываться с IL-11, комплексом, содержащим IL-11, или рецептором IL-11. Антитело может содержать другой фрагмент, обладающий аффинностью в отношении второго антигена, который может представлять собой любой целевой антиген.

Методики получения биспецифичных антител хорошо известны в данной области техники, например, см. Mueller, D *et al.*, (2010 *Biodrugs* **24** (2): 89–98), Wozniak-Knopp G *et al.*, (2010 *Protein Eng Des* **23** (4): 289–297. Baeuerle, PA *et al.*, (2009 *Cancer Res* **69** (12): 4941–4944). Биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты могут быть обеспечены в любом подходящем формате, таком как те форматы, которые описаны в Kontermann MAbs 2012, 4(2): 182-197, которая тем самым полностью включена посредством ссылки. Например, биспецифичное антитело или биспецифичный антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой конъюгат биспецифичного антитела (например, IgG2, F(ab')₂ или CovX-Body), биспецифичный IgG или IgG-подобную молекулу (например, IgG, scFv₄-Ig, IgG-scFv, scFv-IgG, DVD-Ig, IgG-sVD, sVD-

IgG, 2 в 1-IgG, MAT² или Tandemab с общей LC), асимметричную биспецифичную молекулу IgG или IgG-подобную молекулу (например, kih IgG, kih IgG с общей LC, CrossMab, kih IgG-scFab, mAb-Fv, зарядовую пару или SEED-body), малую молекулу биспецифичного антитела (например, диатело (Db), dsDb, DART, scDb, tandAb, тандемный scFv (taFv), тандемный dAb/VHH, тройное тело, тройную головку, Fab-scFv или F(ab')₂-scFv₂), биспецифичный гибридный белок Fc и C_H3 (например, taFv-Fc, Di-диатело, scDb-C_H3, scFv-Fc-scFv, HCAb-VHH, scFv-kih-Fc или scFv-kih-C_H3) или биспецифичный гибридный белок (например, scFv₂-альбумин, scDb-альбумин, taFv-токсин, DNL-Fab₃, DNL-Fab₄-IgG, DNL-Fab₄-IgG-цитокин₂). См., в частности, Фигуру 2 из Kontermann MABs 2012, 4(2): 182-19.

Способы получения биспецифичных антител включают химическое сшивание антител или фрагментов антител, например, с использованием восстанавливаемых дисульфидных или невосстанавливаемых тиоэфирных связей, например, как описано в Segal and Bast, 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1–2.13.16, которая тем самым полностью включена посредством ссылки. Например, *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) можно использовать для химического сшивания, например, фрагментов Fab за счет SH-групп шарнирной области, для создания дисульфид-связанных биспецифичных гетеродимеров F(ab)₂.

Другие способы получения биспецифичных антител включают слияние гибридом, продуцирующих антитела, например, с использованием полиэтиленгликоля, с получением квадромной клетки, способной секретировать биспецифичное антитело, например, как описано в D. M. and Bast, B. J. 2001. Production of Bispecific Antibodies. Current Protocols in Immunology. 14:IV:2.13:2.13.1–2.13.16.

Биспецифичные антитела и биспецифичные антигенсвязывающие фрагменты также могут быть получены рекомбинантно, путем экспрессии, например, из конструкции нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды для антигенсвязывающих молекул, например, как описано в Antibody Engineering: Methods and Protocols, Second Edition (Humana Press, 2012), в главе 40: Production of Bispecific Antibodies: Diabodies and Tandem scFv (Hornig and Färber-Schwarz), или French, How to make bispecific antibodies, Methods Mol. Med. 2000; 40:333-339.

Например, конструкция ДНК, кодирующая переменные домены легкой и тяжелой цепей для двух антигенсвязывающих доменов (т. е. переменные домены легкой и тяжелой цепей для антигенсвязывающего домена, способного связываться с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или рецептором для ангиогенного фактора, и переменные домены легкой и тяжелой цепей для

антигенсвязывающего домена, способного связываться с другим целевым белком), и содержащая последовательности, кодирующие подходящий линкер или домен димеризации между антигенсвязывающими доменами, может быть получена с помощью методик молекулярного клонирования. После этого рекомбинантное биспецифичное антитело может быть получено путем экспрессии (например, *in vitro*) конструкции в подходящей клетке-хозяине (например, в клетке-хозяине млекопитающего), а экспрессированное рекомбинантное биспецифичное антитело затем необязательно может быть очищено.

Аптамеры

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала или способные ингибировать опосредуемую ангиогенным фактором передачу сигнала, представляют собой аптамеры.

Аптамеры, также называемые нуклеиновыми/пептидными лигандами, представляют собой молекулы нуклеиновых кислот или пептидов, характеризующиеся способностью связываться с молекулой-мишенью с высокой специфичностью и высокой аффинностью. Практически каждый аптамер, идентифицированный на сегодняшний день, представляет собой неприродную молекулу.

Аптамеры к конкретной мишени (например, IL-11, IL-11-содержащему комплексу или рецептору IL-11, ангиогенному фактору, комплексу, содержащему ангиогенный фактор, или рецептору для ангиогенного фактора) могут быть идентифицированы и/или получены с помощью способа Систематической Эволюции Лигандов путем Экспоненциального обогащения (SELEXTM) или путем разработки СОМАмеров («SOMAmer») (модифицированных аптамеров с низкой скоростью диссоциации) (Gold Let al. (2010) PLoS ONE 5(12):e15004). Аптамеры и SELEX описаны в TuERK and Gold, Science (1990) 249(4968):505-10 и в WO 91/19813. Применение технологии SELEX и СОМАмеров включает, например, добавление функциональных групп, которые имитируют боковые цепи аминокислот, для увеличения химического разнообразия аптамера. В результате этого могут быть обогащены и идентифицированы аптамеры с высокой аффинностью в отношении мишени.

Аптамеры могут представлять собой молекулы ДНК или РНК и могут быть одноцепочечными или двухцепочечными. Аптамер может содержать химически модифицированные нуклеиновые кислоты, например, в которых сахар и/или фосфат, и/или основание химически модифицированы. Такие модификации могут улучшать

стабильность аптамера или делать аптамеры более устойчивыми к разрушению и могут включать модификацию в 2' положении рибозы.

Аптамеры могут быть синтезированы с помощью способов, хорошо известных квалифицированному специалисту. Например, аптамеры могут быть синтезированы химическим путем, например, на твердом носителе. В твердофазном синтезе можно использовать фосфоамидитную химию. В общих чертах, нуклеотид на твердой подложке детритилируют, затем связывают с фосфоамидитом нуклеозида, активированным соответствующим образом, с образованием фосфитной сложной триэфирной связи. Затем может быть проведено экпирование с последующим окислением фосфитного сложного триэфира окислителем, как правило, йодом. Затем цикл может быть повторен для сборки аптамера (например, см. Sinha, N. D.; Biernat, J.; McManus, J.; Köster, H. *Nucleic Acids Res.* 1984, 12, 4539; и Beaucage, S. L.; Lyer, R. P. (1992). *Tetrahedron* 48 (12): 2223).

Подходящие аптамеры на основе нуклеиновых кислот необязательно могут иметь минимальную длину, такую как одно из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 нуклеотидов. Подходящие аптамеры на основе нуклеиновых кислот необязательно могут иметь максимальную длину, такую как одно из 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 нуклеотидов. Подходящие аптамеры на основе нуклеиновых кислот необязательно могут иметь длину, такую как одно из 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 нуклеотидов.

Аптамеры могут представлять собой пептиды, выбранные или модифицированные для связывания конкретных молекул-мишеней. Пептидные аптамеры и способы их получения и идентификации рассмотрены в Reverdatto et al., *Curr Top Med Chem.* (2015) 15(12):1082-101, которая тем самым полностью включена посредством ссылки. Пептидные аптамеры необязательно могут иметь минимальную длину, такую как одно из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. Пептидные аптамеры необязательно могут иметь максимальную длину, такую как одно из 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 аминокислот. Подходящие пептидные аптамеры необязательно могут иметь длину, такую как одно из 2-30, 2-25, 2-20, 5-30, 5-25 или 5-20 аминокислот.

Аптамеры могут иметь K_d в диапазоне нМ или пМ, например, менее чем одно из 500 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ.

Агенты, способные уменьшать экспрессию фактора или рецептора

Согласно аспектам настоящего изобретения антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и/или антагонист ангиогенного фактора способен предотвращать или уменьшать экспрессию одной или более мишеней.

Экспрессия может представлять собой экспрессию гена или белка.

Экспрессия гена может быть измерена различными средствами, известными специалистам в данной области техники, например, путем измерения уровней иРНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) или способов на основе репортеров. Аналогичным образом, экспрессия белка может быть измерена различными способами, хорошо известными в данной области техники, например, способами на основе антител, например, с помощью вестерн-блоттинга, иммуногистохимии, иммуноцитохимии, проточной цитометрии, ИФА, ELISPOT, или способами на основе репортеров. Экспрессия может осуществляться клеткой/тканью/органом/системой органов субъекта.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может представлять собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, такую как антисмысловая или малая интерферирующая РНК (миРНК), включая, но не ограничиваясь ими, короткую шпилечную РНК (кшРНК) или миРНК.

Молекулы олигонуклеотидов, в частности, РНК, можно применять для регуляции экспрессии генов. Они включают антисмысловые олигонуклеотиды, нацеленное разрушение иРНК с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК), посттранскрипционное выключение гена (PTGS), онтогенетически регулируемое специфичное для последовательности трансляционное подавление иРНК с помощью микро-РНК (мкРНК), а также нацеленное транскрипционное подавление гена.

Антисмысловой олигонуклеотид представляет собой олигонуклеотид, предпочтительно одноцепочечный, который нацелен и связывается, за счет связывания комплементарной последовательности, с олигонуклеотидом-мишенью, например, иРНК. Если олигонуклеотид-мишень представляет собой иРНК, связывание антисмысловой молекулы с иРНК блокирует трансляцию иРНК и экспрессию продукта гена. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть сконструированы для связывания смысловой геномной нуклеиновой кислоты и ингибирования транскрипции целевой нуклеотидной последовательности.

Была продемонстрирована роль аппарата РНКи и малых РНК в нацеливании на комплексы гетерохроматина и в эпигенетическом подавлении генов в конкретных хромосомных локусах. Посттранскрипционное выключение (silencing), зависимое от двухцепочечной РНК (дцРНК), также известное как РНК-интерференция (РНКи), представляет собой феномен, при котором комплексы дцРНК могут нацелено действовать на конкретные гомологичные гены для подавления за короткий период времени. Она действует в качестве сигнала, стимулирующего разрушение иРНК с идентичной последовательностью. МиРНК из 20 нуклеотидов обычно достаточно длинная, чтобы индуцировать специфичное в отношении гена подавление, но достаточно короткая, чтобы избежать ответа хозяина. Снижение экспрессии продуктов генов-мишеней может быть значительным, при этом несколько молекул миРНК индуцируют 90% подавление. Терапевтические средства на основе РНКи прошли в фазу I, II и III клинических исследований по ряду показаний (Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433).

В данной области техники эти последовательности РНК называют «короткими или малыми интерферирующими РНК» (миРНК) или «микроРНК» (мкРНК) в зависимости от их происхождения. Оба типа последовательности можно применять для отрицательной регуляции экспрессии гена путем связывания с комплементарными РНК и либо запуска устранения иРНК (РНКи), либо блокирования трансляции иРНК в белок. МиРНК получают путем процессинга длинных двухцепочечных РНК, а при обнаружении в природе они, как правило, имеют экзогенное происхождение. Интерферирующие микроРНК (мкРНК) представляют собой эндогенно кодируемые небольшие некодирующие РНК, полученные путем процессинга коротких шпилек. Как миРНК, так и мкРНК могут ингибировать трансляцию иРНК, несущих частично комплементарные последовательности-мишени, без расщепления РНК, и могут разрушать иРНК, несущие полностью комплементарные последовательности.

миРНК-лиганды, как правило, являются двухцепочечными, и для оптимизации эффективности опосредуемой РНК отрицательной регуляции функции гена-мишени длину молекулы миРНК предпочтительно выбирают так, чтобы обеспечить правильное распознавание миРНК комплексом RISC, который опосредует распознавание иРНК-мишени миРНК, и поэтому миРНК достаточно короткая, чтобы уменьшить ответ хозяина.

мкРНК-лиганды, как правило, являются одноцепочечными и имеют области, которые частично комплементарны, что позволяет лигандам образовывать шпильку. мкРНК представляют собой РНК-гены, которые транскрибируются с ДНК, но не транслируются в белок. Последовательность ДНК, которая кодирует ген мкРНК, длиннее, чем мкРНК. Эта последовательность ДНК содержит последовательность мкРНК и

приблизительную обратнoкомплементарную последовательность. При транскрибировании этой последовательности ДНК в одноцепочечную молекулу РНК последовательность мкРНК и ее обратнoкомплементарная последовательность спариваются с образованием частично двухцепочечного сегмента РНК. Дизайн последовательностей микроРНК обсуждается в John et al, PLoS Biology, 11(2), 1862-1879, 2004.

Как правило, РНК-лиганды, предназначенные для имитации эффектов миРНК или мкРНК, имеют от 10 до 40 рибонуклеотидов (или их синтетических аналогов), более предпочтительно от 17 до 30 рибонуклеотидов, более предпочтительно от 19 до 25 рибонуклеотидов и наиболее предпочтительно от 21 до 23 рибонуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, в которых применяется двухцепочечная миРНК, молекула может иметь симметричные 3'-липкие концы, например, из одного или двух (рибо)нуклеотидов, как правило, UU или dTdT 3'-липкий конец. На основании раскрытия, представленного в настоящей заявке, квалифицированный специалист в данной области техники сможет легко сконструировать подходящие последовательности миРНК и мкРНК, например, с использованием таких ресурсов как программа поиска миРНК Ambion. Последовательности миРНК и мкРНК могут быть получены синтетически и добавлены экзогенно, чтобы вызвать отрицательную регуляцию гена, или могут быть получены с использованием систем экспрессии (например, векторов). Согласно предпочтительному варианту реализации миРНК синтезирована синтетически.

Более длинные двухцепочечные РНК могут подвергаться процессингу в клетке с получением миРНК (см., например, Myers (2003) Nature Biotechnology 21:324-328). Более длинная молекула дцРНК может иметь симметричные 3'- или 5'-липкие концы, например, из одного или двух (рибо)нуклеотидов, или может иметь тупые концы. Более длинные молекулы дцРНК могут содержать 25 нуклеотидов или более. Предпочтительно более длинные молекулы дцРНК имеют от 25 до 30 нуклеотидов в длину. Более предпочтительно более длинные молекулы дцРНК имеют от 25 до 27 нуклеотидов в длину. Наиболее предпочтительно более длинные молекулы дцРНК имеют 27 нуклеотидов в длину. дцРНК из 30 или более нуклеотидов в длину можно экспрессировать с использованием вектора pDECAP (Shinagawa et al., Genes and Dev., 17, 1340-5, 2003).

Другой альтернативой является экспрессия молекулы короткой шпилечной РНК (кшРНК) в клетке. КшРНК более стабильны, чем синтетические миРНК. КшРНК состоит из коротких инвертированных повторов, разделенных последовательностью небольшой

петли. Один инвертированный повтор комплементарен гену-мишени. В клетке кшРНК подвергается процессингу DICER с получением миРНК, которая разрушает иРНК гена-мишени и подавляет экспрессию. Согласно предпочтительному варианту реализации кшРНК получают эндогенно (внутри клетки) путем транскрипции с вектора. КшРНК могут быть получены в клетке путем трансфекции клетки вектором, кодирующим последовательность кшРНК под контролем промотора РНК-полимеразы III, такого как промотор H1 или 7SK человека, или промотора РНК-полимеразы II. В качестве альтернативны, кшРНК может быть синтезирована экзогенно (*in vitro*) путем транскрипции с вектора. Затем кшРНК может быть введена непосредственно в клетку.

Предпочтительно последовательность кшРНК имеет от 40 до 100 оснований в длину, более предпочтительно от 40 до 70 оснований в длину. Стержень шпильки предпочтительно имеет от 19 до 30 пар оснований в длину. Стержень может содержать пары G-U для стабилизации структуры шпильки.

Молекулы миРНК, более длинные молекулы дцРНК или молекулы мкРНК могут быть получены рекомбинантно путем транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, предпочтительно содержащейся в векторе. Предпочтительно молекула миРНК, более длинная молекула дцРНК или молекула мкРНК содержит неполную последовательность целевого фактора или рецептора.

Согласно одному варианту реализации миРНК, более длинную дцРНК или мкРНК получают эндогенно (внутри клетки) путем транскрипции с вектора. Вектор может быть введен в клетку любым из путей, известных в данной области техники. Необязательно экспрессию последовательности РНК можно регулировать с использованием тканеспецифичного (например, специфичного для сердца, печени, почек или глаза) промотора. Согласно дополнительному варианту реализации миРНК, более длинную дцРНК или мкРНК получают экзогенно (*in vitro*) путем транскрипции с вектора.

Подходящие векторы могут представлять собой олигонуклеотидные векторы, сконфигурированные для экспрессии олигонуклеотидного агента, способного к подавлению. Такие векторы могут представлять собой вирусные векторы или плазмидные векторы. Терапевтический олигонуклеотид может быть включен в геном вирусного вектора и функционально связан с регуляторной последовательностью, например, промотором, которая управляет его экспрессией. Термин «функционально связанный» может включать ситуацию, при которой выбранная нуклеотидная последовательность и регуляторная нуклеотидная последовательность ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия нуклеотидной последовательности находилось под влиянием или контролем регуляторной последовательности. Таким образом, регуляторная

последовательность функционально связана с выбранной нуклеотидной последовательностью, если регуляторная последовательность способна осуществлять транскрипцию нуклеотидной последовательности, которая образует часть или всю выбранную нуклеотидную последовательность.

5 Вирусные векторы, кодирующие экспрессируемые промотором последовательности миРНК, известны в данной области техники и их преимущество заключается в длительной экспрессии терапевтического олигонуклеотида. Примеры включают лентивирус (Nature 2009 Jan 22; 457(7228):426-433), аденовирус (Shen et al., FEBS Lett 2003 Mar 27; 539(1-3):111-4) и ретровирусы (Barton and Medzhitov PNAS November 12, 2002
10 vol.99, no.23 14943-14945).

Согласно другим вариантам реализации вектор может быть сконфигурирован так, чтобы облегчать доставку терапевтического олигонуклеотида в место, в котором требуется подавление экспрессии. Такие векторы, как правило, включают объединение олигонуклеотида с положительно заряженным вектором (например, катионными
15 пептидами, проникающими в клетки, катионными полимерами и дендримерами, а также катионными липидами); конъюгирование олигонуклеотида с малыми молекулами (например, холестерином, желчными кислотами и липидами), полимерами, антителами и РНК; или инкапсулирование олигонуклеотида в составах наночастиц (Wang et al., AAPS J. 2010 Dec; 12(4): 492-503).

20 Согласно одному варианту реализации вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты как в смысловой, так и в антисмысловой ориентации так, что при экспрессии в виде РНК смысловой и антисмысловой участки будут ассоциироваться с образованием двухцепочечной РНК.

В качестве альтернативы, молекулы миРНК могут быть синтезированы с
25 использованием стандартных методик твердофазного синтеза или синтеза в растворе, которые известны в данной области техники. Связи между нуклеотидами могут представлять собой фосфодиэфирные связи или другие связи, например, связывающие группы формулы $P(O)S$, (тиоат); $P(S)S$, (дитиоат); $P(O)NR'_2$; $P(O)R'$; $P(O)OR_6$; CO ; или $CONR'_2$, где R представляет собой H (или соль) или алкил ($1-12C$), и R_6 представляет
30 собой алкил ($1-9C$), присоединенные к соседним нуклеотидам посредством $-O-$ или $-S-$.

Модифицированные нуклеотидные основания могут применяться в дополнение к природным основаниям и могут придавать предпочтительные свойства содержащим их молекулам миРНК.

Например, модифицированные основания могут повышать стабильность молекулы
35 миРНК, что уменьшает количество, необходимое для подавления. Предоставление

модифицированных оснований также может обеспечивать молекулы миРНК, которые более, или менее, стабильны, чем немодифицированные миРНК.

Термин «модифицированное нуклеотидное основание» включает нуклеотиды с ковалентно модифицированным основанием и/или сахаром. Например, модифицированные нуклеотиды включают нуклеотиды, содержащие сахара, которые ковалентно присоединены к низкомолекулярным органическим группам, отличным от гидроксильной группы в 3'-положении и отличным от фосфатной группы в 5'-положении. Таким образом, модифицированные нуклеотиды также могут включать 2'-замещенные сахара, такие как 2'-О-метил-, 2'-О-алкил, 2'-О-аллил, 2'-S-алкил, 2'-S-аллил, 2'-фтор-, 2'-галоген или азидо-рибоза, карбоциклические аналоги сахаров, α-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара и седогептулозу.

Модифицированные нуклеотиды известны в данной области техники и включают алкилированные пурины и пиримидины, ацилированные пурины и пиримидины, а также другие гетероциклы. Эти классы пиримидинов и пуринов известны в данной области техники и включают псевдоизоцитозин, N⁴,N⁴-этаноцитозин, 8-гидрокси-N⁶-метиладенин, 4-ацетилцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил)урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил, 5-карбоксиметиламин метил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламин метилурацил, дигидроурацил, инозин, N⁶-изопентиладенин, 1-метиладенин, 1-метилпсевдурацил, 1-метилгуанин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-метилцитозин, 5-метилцитозин, N⁶-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-метиламин метилурацил, 5-метоксиамин метил-2-тиоурацил, -D-маннозилквейозин, 5-метоксикарбонил метилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N⁶-изопентениладенин, сложный метиловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, псевдоурацил, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил, 4-тиоурацил, 5-метилурацил, сложный метиловый эфир N-урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусную кислоту, квейозин, 2-тиоцитозин, 5-пропилурацил, 5-пропилцитозин, 5-этилурацил, 5-этилцитозин, 5-бутилурацил, 5-пентилурацил, 5-пентилцитозин и 2,6-диаминопурин, метилпсевдоурацил, 1-метилгуанин, 1-метилцитозин.

Способы, относящиеся к применению РНКи для подавления генов у *C. elegans*, *Drosophila*, растений и млекопитающих, известны в данной области техники (Fire A, et al., 1998 Nature 391:806-811; Fire, A. Trends Genet. 15, 358-363 (1999); Sharp, P. A. RNA interference 2001. Genes Dev. 15, 485-490 (2001); Hammond, S. M., et al., Nature Rev. Genet. 2, 110-1119 (2001); Tuschl, T. Chem. Biochem. 2, 239-245 (2001); Hamilton, A. et al., Science 286, 950-952 (1999); Hammond, S. M., et al., Nature 404, 293-296 (2000); Zamore, P. D., et al.,

Cell 101, 25-33 (2000); Bernstein, E., et al., Nature 409, 363-366 (2001); Elbashir, S. M., et al., Genes Dev. 15, 188-200 (2001); WO0129058; WO9932619, и Elbashir S M, et al., 2001 Nature 411:494-498).

Нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную миРНК. (Как
5 будет понятно квалифицированному специалисту и как подробно объяснено ниже, молекула миРНК также может содержать короткую 3'-последовательность ДНК.)

Ожидается, что абсолютная идентичность/комплементарность между нуклеиновой
кислотой согласно настоящему изобретению и последовательностью-мишенью не
является существенной, тем не менее, она является предпочтительной. Соответственно,
10 нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать одно несоответствие по сравнению с иРНК мишени. Однако ожидается, что наличие даже одного несоответствия, вероятно, приведет к уменьшению эффективности, поэтому отсутствие несоответствий является предпочтительным. Если присутствуют 3'-липкие концы, они могут быть исключены из рассмотрения количества несоответствий.

Термин «комплементарность» не ограничивается стандартным спариванием
15 оснований между нуклеиновыми кислотами, состоящими из природных рибо- и/или дезоксирибонуклеотидов, но также включает спаривание оснований между иРНК и нуклеиновыми кислотами согласно настоящему изобретению, которые содержат неприродные нуклеотиды.

Цепи, которые образуют двухцепочечную РНК, могут иметь короткие 3'-
20 динуклеотидные липкие концы, которые могут представлять собой ДНК или РНК. Применение 3'-ДНК липкого конца не оказывает влияния на активность миРНК по сравнению с 3'-РНК липким концом, но уменьшает стоимость химического синтеза цепей нуклеиновой кислоты (Elbashir et al., 2001c). По этой причине динуклеотиды ДНК могут
25 быть предпочтительными.

В случае их наличия, динуклеотидные липкие концы могут быть симметричными
друг другу, но это не существенно. Действительно, 3'-липкий конец смысловой (верхней)
цепи не имеет отношения к активности РНКи, поскольку он не участвует в распознавании
и разрушении иРНК (Elbashir et al., 2001a, 2001b, 2001c).

Несмотря на то, что эксперименты с РНКи на *Drosophila* показывают, что
30 антисмысловые 3'-липкие концы могут участвовать в распознавании и нацеливании на иРНК (Elbashir et al. 2001c), по-видимому, 3'-липкие концы не являются необходимыми для РНКи-активности миРНК в клетках млекопитающих. Таким образом, считается, что

некорректная ренатурация 3'-липких концов оказывает незначительное влияние в клетках млекопитающих (Elbashir et al. 2001c; Czauderna et al. 2003).

Таким образом, любой динуклеотидный липкий конец можно применять в антисмысловой цепи миРНК. Тем не менее, динуклеотид предпочтительно представляет собой -UU или -UG (или -TT или -TG, если липкий конец представляет собой ДНК), более предпочтительно -UU (или -TT). Динуклеотидный липкий конец -UU (или -TT) наиболее эффективен и соответствует (т. е. способен образовывать его часть) сигналу окончания транскрипции РНК-полимеразы III (терминаторный сигнал представляет собой ТТТТТ). Соответственно, этот динуклеотид является наиболее предпочтительным. Также можно применять динуклеотиды AA, CC и GG, но они менее эффективны и, следовательно, менее предпочтительны.

Более того, 3'-липкие концы могут быть полностью исключены из миРНК.

Согласно настоящему изобретению также предложены одноцепочечные нуклеиновые кислоты (называемые в настоящей заявке одноцепочечными миРНК), соответственно, состоящие из компонентной цепи одной из вышеупомянутых двухцепочечных нуклеиновых кислот, предпочтительно с 3'-липкими концами, но необязательно без них. Согласно настоящему изобретению также предложены наборы, содержащие пары таких одноцепочечных нуклеиновых кислот, которые способны гибридизоваться друг с другом *in vitro* с образованием вышеупомянутых двухцепочечных миРНК, которые затем могут быть введены в клетки.

Комплементарные части обычно будут соединены спейсером, который имеет подходящую длину и последовательность, чтобы обеспечить гибридизацию двух комплементарных частей друг с другом. Две комплементарные (то есть смысловая и антисмысловая) части могут быть соединены 5'-3' в любом порядке. Спейсер, как правило, будет представлять собой короткую последовательность из приблизительно 4-12 нуклеотидов, предпочтительно 4-9 нуклеотидов, более предпочтительно 6-9 нуклеотидов.

Предпочтительно 5'-конец спейсера (расположенный непосредственно в 3'-направлении относительно предшествующей комплементарной части) состоит из нуклеотидов -UU- или -UG-, как упоминалось выше, -UU- являются предпочтительными (однако, как упоминалось выше, применение этих конкретных динуклеотидов не является существенным). Подходящий спейсер, рекомендованный для применения в системе pSuper от OligoEngine (Сизтл, Вашингтон, США), представляет собой UUCAAGAGA. В этом и других случаях концы спейсера могут гибридизоваться друг с другом, например, удлиняя двухцепочечный мотив за пределы точных последовательностей мишени на небольшое число (например, 1 или 2) пар оснований.

Аналогичным образом, транскрибируемая РНК предпочтительно содержит 3'-липкий конец из последующей комплементарной части. Как упоминалось выше, предпочтительно он представляет собой -UU или -UG, более предпочтительно -UU.

5 Такие молекулы кшРНК затем могут быть расщеплены в клетке млекопитающего ферментом DICER с получением двухцепочечной миРНК, описанной выше, в которой одна или каждая цепь гибридной дцРНК содержит 3'-липкий конец.

Безусловно, методики синтеза нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению хорошо известны в данной области техники.

10 Квалифицированный специалист в данной области техники вполне сможет сконструировать подходящие векторы транскрипции для ДНК согласно настоящему изобретению с использованием хорошо известных методик и коммерчески доступных материалов. В частности, ДНК будет ассоциирована с контрольными последовательностями, включая промотор и последовательность терминации транскрипции.

15 Коммерчески доступные системы pSuper и pSuperior от OligoEngine (Сизтл, Вашингтон, США) являются особенно подходящими. В них используется промотор полимеразы-III (H1) и последовательность терминатора транскрипции T5, которая вносит два остатка U на 3'-конце транскрипта (которые, после процессинга DICER, обеспечивают 3'-UU липкий конец одной цепи миРНК).

20 Другая подходящая система описана в Shin et al. (RNA, 2009 May; 15(5): 898-910), в которой применяется другой промотор полимеразы-III (U6).

Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена композиция, содержащая двухцепочечную миРНК согласно настоящему изобретению или вектор транскрипции согласно настоящему изобретению в смеси с одним или более
25 фармацевтически приемлемыми носителями. Подходящие носители включают липофильные носители или везикулы, которые могут облегчать проникновение через мембрану клетки.

Материалы и способы, подходящие для введения дуплексов миРНК и ДНК-векторов согласно настоящему изобретению, хорошо известны в данной области техники, и
30 улучшенные способы находятся на этапе разработки, учитывая потенциал технологии РНКи.

Обычно доступно множество методик введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих. Выбор методики будет зависеть от того, переносится ли нуклеиновая кислота в культивируемые клетки *in vitro* или *in vivo* в клетки пациента. Методики,
35 подходящие для переноса нуклеиновой кислоты в клетки млекопитающих *in vitro*,

включают использование липосом, электропорации, микроинъекции, слияния клеток, DEAE, декстрана и осаждения фосфатом кальция. Методики переноса гена *in vivo* включают трансфекцию вирусными (обычно ретровирусными) векторами и трансфекцию, опосредуемую белком вирусной оболочки-липосомами (Dzau et al. (2003) Trends in Biotechnology 11, 205-210).

В частности, подходящие методики клеточного введения нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению как *in vitro*, так и *in vivo* раскрыты в следующих статьях:

Общие обзоры: Borkhardt, A. 2002. Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment? Cancer Cell. 2:167-8. Hannon, G.J. 2002. RNA interference. Nature. 418:244-51. McManus, M.T., and P.A. Sharp. 2002. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. Nat Rev Genet. 3:737-47. Scherr, M., M.A. Morgan, and M. Eder. 2003b. Gene silencing mediated by small interfering RNAs in mammalian cells. Curr Med Chem. 10:245-56. Shuey, D.J., D.E. McCallus, and T. Giordano. 2002. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. Drug Discov Today. 7:1040-6.

Системная доставка с использованием липосом: Lewis, D.L., J.E. Hagstrom, A.G. Loomis, J.A. Wolff, and H. Herweijer. 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. Nat Genet. 32:107-8. Paul, C.P., P.D. Good, I. Winer, and D.R. Engelke. 2002. Effective expression of small interfering RNA in human cells. Nat Biotechnol. 20:505-8. Song, E., S.K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar, and J. Lieberman. 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. Nat Med. 9:347-51. Sorensen, D.R., M. Leirdal, and M. Sioud. 2003. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. J Mol Biol. 327:761-6.

Опосредуемый вирусом перенос: Abbas-TERKi, T., W. Blanco-Bose, N. Deglon, W. Pralong, and P. Aebischer. 2002. Lentiviral-mediated RNA interference. Hum Gene Ther. 13:2197-201. Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2002. Retroviral delivery of small interfering RNA into primary cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:14943-5. Devroe, E., and P.A. Silver. 2002. Retrovirus-delivered siRNA. BMC Biotechnol. 2:15. Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisziewicz. 2002. Gene therapy approaches to HIV infection. Am J Pharmacogenomics. 2:245-52. Matta, H., B. Hozayev, R. Tomar, P. Chugh, and P.M. Chaudhary. 2003. Use of lentiviral vectors for delivery of small interfering RNA. Cancer Biol Ther. 2:206-10. Qin, X.F., D.S. An, I.S. Chen, and D. Baltimore. 2003. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. Proc Natl Acad Sci U S A. 100:183-8. Scherr, M., K. Battmer, A. Ganser, and M. Eder. 2003a. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. Cell Cycle. 2:251-7. Shen,

C., A.K. Buck, X. Liu, M. Winkler, and S.N. Reske. 2003. Gene silencing by adenovirus-delivered siRNA. FEBS Lett. 539:111-4.

Доставка с помощью пептидов: Morris, M.C., L. Chaloin, F. Heitz, and G. Divita. 2000. Translocating peptides and proteins and their use for gene delivery. Curr Opin Biotechnol. 11:461-6. Simeoni, F., M.C. Morris, F. Heitz, and G. Divita. 2003. Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. Nucleic Acids Res. 31:2717-24. Другие технологии, которые могут быть подходящими для доставки миРНК к клеткам-мишеням, основаны на наночастицах или нанокапсулах, таких как те, которые описаны в патентах США № 6,649,192В и 5,843,509В.

Ангиогенез и ангиогенные факторы

Ангиогенез представляет собой физиологический процесс, посредством которого из ранее существовавших сосудов образуются новые кровеносные сосуды. Это жизненно важный процесс для роста, заживления ран и при развитии злокачественной опухоли. Положительная регуляция ангиогенеза является распространенным признаком при заболеваниях глаза и, в частности, при неоваскулярных заболеваниях сетчатки. Развитие и поддержание сосудистой сети имеет решающее значение для нормальной функции всех паренхимных тканей, а нарушения приводят к заболеванию и органной недостаточности, в частности, при заболеваниях глаз, описанных в настоящей заявке. Большинство неоваскулярных заболеваний сетчатки приводят к фиброзу.

Были идентифицированы многочисленные индукторы ангиогенеза, включая представителей семейства факторов роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтины, трансформирующие факторы роста (TGF), тромбоцитарный фактор роста, фактор некроза опухоли- α , интерлейкины и представителей семейства факторов роста фибробластов (FGF). Клеточные и молекулярные механизмы ангиогенеза описаны в Adams & Alitalo, Nature Reviews Molecular Cell Biology volume 8, pages 464–478 (2007), и Otrrock et al, *Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms*, Blood Cells, Molecules, and Diseases, Volume 39, Issue 2, 2007, Pages 212-220, которые полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки.

В настоящей заявке термин «ангиогенный фактор» относится к любому фактору (например, пептиду/полипептиду, гликопротеину, липопротеину, гликану, гликолипиду, липиду, нуклеиновой кислоте или ее фрагменту), способному индуцировать/усиливать/стимулировать ангиогенез. Факторы, способные индуцировать/усиливать/стимулировать ангиогенез, могут быть идентифицированы, например, с помощью исследования в анализе ангиогенеза *in vitro* или *in vivo*.

Подходящие анализы для исследования ангиогенеза включают анализы миграции эндотелиальных клеток, анализы пролиферации эндотелиальных клеток и анализы образования эндотелиальной трубки. Анализы ангиогенеза подробно описаны в Adair TH, Montani JP. *Angiogenesis*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010, *Chapter* 2, *Angiogenesis Assays*, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ангиогенный фактор представляет собой полипептид или полипептидный комплекс, способный индуцировать/стимулировать ангиогенез. Ангиогенный фактор может быть растворимым или связанным с мембраной и может представлять собой лиганд в виде полипептида или полипептидного комплекса, или рецептор в виде полипептида или полипептидного комплекса для такого лиганда. Ангиогенный фактор может происходить из любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ангиогенного фактора из любого вида. Согласно предпочтительным вариантам реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*). Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ангиогенного фактора необязательно могут характеризоваться, как имеющие по меньшей мере 70%, предпочтительно одно из 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью незрелого или зрелого ангиогенного фактора из конкретного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи ангиогенного фактора необязательно могут характеризоваться способностью связываться с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора (например, рецептором для ангиогенного фактора или лигандом для ангиогенного фактора) и/или способностью индуцировать/стимулировать ангиогенез. Например, ангиогенный фактор может представлять собой VEGF, рецептор VEGF, FGF, рецептор FGF, PDGF или рецептор, PDGF, или фрагмент, вариант, изоформу или гомолог VEGF, рецептора VEGF, FGF, рецептора FGF, PDGF или рецептора PDGF.

Фрагмент полипептида ангиогенного фактора может быть любой длины (по количеству аминокислот), но необязательно может быть по меньшей мере 25% от длины зрелого ангиогенного фактора и может иметь максимальную длину, такую как одно из 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины зрелого ангиогенного фактора. Ангиогенный фактор может представлять собой комплекс, содержащий одну или более субъединиц, такой как гетеро- или гомодимер.

В настоящей заявке «партнер по взаимодействию для ангиогенного фактора» относится к любому фактору (например, полипептиду или полипептидному комплексу),

способному взаимодействовать (например, связываться с ним) с ангиогенным фактором. Взаимодействие может представлять собой нековалентную ассоциацию.

Ангиогенный фактор и партнер по взаимодействию для ангиогенного фактора предпочтительно ассоциируются с образованием биологически функционального комплекса, например, комплекса рецептор:лиганд, способного инициировать/стимулировать передачу сигнала (например, проангиогенную передачу сигнала). Партнер по взаимодействию для ангиогенного фактора может представлять собой, например, рецептор для ангиогенного фактора или лиганд для ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения взаимодействие между партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора и ангиогенным фактором индуцирует/стимулирует проангиогенную передачу сигнала и/или ангиогенез. Например, связывание VEGF с рецептором VEGF способно запускать внутриклеточную передачу сигнала клетками, экспрессирующими рецептор VEGF, что индуцирует/стимулирует ангиогенные процессы.

Например, партнер по взаимодействию для ангиогенного фактора может представлять собой рецептор ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор ангиогенного фактора может представлять собой полипептид или полипептидный комплекс, способный связывать VEGF, FGF, PDGF или фрагмент, вариант, изоформу или гомолог VEGF, FGF или PDGF. Рецепторы ангиогенного фактора включают, например, рецепторы VEGF, рецепторы FGF и рецепторы PDGF. Следует понимать, что рецепторы ангиогенного фактора представляют собой ангиогенные факторы в соответствии с настоящим раскрытием. Например, VEGFR является как ангиогенным фактором (т. е. фактором, способным индуцировать/усиливать/стимулировать ангиогенез), так и рецептором ангиогенного фактора (т. е. рецептором VEGF).

Аналогичным образом, партнер по взаимодействию для ангиогенного фактора может представлять собой лиганд для рецептора ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лиганд для рецептора ангиогенного фактора может представлять собой полипептид или полипептидный комплекс, способный связывать рецептор VEGF, рецептор FGF, рецептор PDGF, или фрагмент, вариант, изоформу или гомолог рецептора VEGF, рецептора FGF или рецептора PDGF. Лиганды ангиогенного фактора включают, например, VEGF, FGF и PDGF. Следует понимать, что лиганды ангиогенного фактора представляют собой ангиогенные факторы в соответствии с настоящим раскрытием. Например, VEGF представляет собой как ангиогенный фактор (т. е. фактор, способный

индуцировать/усиливать/стимулировать ангиогенез), так и лиганд для рецептора ангиогенного фактора (т. е. лиганд для рецептора VEGF).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения любой способ или композицию, предложенные в настоящей заявке, можно применять для

5 лечения/предотвращения ангиогенеза, в случае фиброза или в ином случае.

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ангиогенный фактор представляет собой VEGF. VEGF представляет собой фактор роста, кодируемый семейством генов, которое включает плацентарный фактор роста (PIGF, AAD30179.1 GI: 4809334), VEGF-A (AAP86646.1 GI: 32699990), VEGF-B (AAC50721.1 GI: 1488259), VEGF-C (CAA63907.1 GI: 1182005), VEGF-D (BAA24264.1 GI: 2766190) и VEGF-E, кодируемый вирусом контагиозного пустулезного дерматита (ABA00650.1 GI: 74230845). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения VEGF представляет собой VEGF-A. Различия в сплайсинге экзонов приводят к образованию четырех

10 основных изоформ VEGF-A: VEGF121, VEGF165, VEGF189 и VEGF206, которые после отщепления сигнальной последовательности содержат 121, 165, 189 и 206 аминокислот, соответственно [65]. VEGF165, по-видимому, является преобладающей изоформой.

VEGF стимулирует рост клеток эндотелия сосудов, происходящих из артерий, вен и лимфатической системы, а также индуцирует ангиогенез в различных моделях *in vivo* (т. е. образование тонкостенных структур, выстланных эндотелием), вызывая быстрое

15 повышение проницаемости микрососудистой сети [66-68].

В данном описании «VEGF» относится к VEGF (например, VEGF-A, B, C, D или E) из любого вида и включает изоформы, фрагменты, варианты или гомологи VEGF из любого вида. Согласно предпочтительным вариантам реализации вид представляет собой человека (*Homo sapiens*). Фрагмент VEGF может быть любой длины (по количеству аминокислот), но необязательно может быть по меньшей мере 25% от длины зрелого VEGF и может иметь максимальную длину, такую как одно из 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины зрелого VEGF. Фрагмент VEGF может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину, такую

25 как одно из 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220 или 225 аминокислот.

VEGF оказывает свое биологическое действие посредством связывания с тремя рецепторами VEGFR1 (AAH39007.1 GI: 24660372), VEGFR2 (P35968.2 GI: 9087218) и VEGFR3 (AAA85215.1 GI: 1150991). Каждый рецептор имеет внеклеточные связывающие

35 домены для VEGF, трансмембранную последовательность и внутриклеточные

тирозинкиназные фрагменты. Связывание VEGF с внеклеточным доменом рецептора димеризует рецепторы и приводит к фосфорилированию внутриклеточных тирозинкиназных фрагментов.

В данном описании «рецептор для VEGF» или «рецептор VEGF» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, способному связывать VEGF. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор VEGF способен связывать VEGF и индуцировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих указанный рецептор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения «рецептор для VEGF» относится к VEGFR. В данном описании, если не указано иное, «VEGFR» относится к VEGFR1, VEGFR2 и/или VEGFR3.

VEGFR необязательно может характеризоваться, как имеющий по меньшей мере 70%, предпочтительно одно из 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью VEGFR из конкретного вида, например, человека. Изоформы, фрагменты, варианты или гомологи VEGFR необязательно могут характеризоваться способностью связывать VEGF (предпочтительно из того же вида) и стимулировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих VEGFR. Фрагмент рецептора VEGF может быть любой длины (по количеству аминокислот), но необязательно может быть по меньшей мере 25% от длины зрелого VEGFR и имеет максимальную длину, такую как одно из 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% от длины зрелого VEGFR. Фрагмент рецептора VEGF может иметь минимальную длину 10 аминокислот и максимальную длину, такую как одно из 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1100, 1110, 1120, 1130, 1140, 1150, 1160, 1170, 1180, 1190, 1200, 1210, 1220, 1230, 1240, 1250, 1260, 1270, 1280, 1290, 1300, 1310, 1320, 1330, 1340, 1350, 1360, 1370, 1380, 1390, 1400, 1410, 1420, 1430, 1440, 1450, 1460, 1470, 1480, 1490, 1500, 1510, 1520, 1530, 1540, 1550, 1560, 1570, 1580, 1590, 1600, 1610, 1620, 1630, 1640, 1650, 1660, 1670, 1680, 1690, 1700, 1710, 1720, 1730, 1740, 1750, 1760, 1770, 1780, 1790 или 1795 аминокислот.

Факторы роста фибробластов (FGF)

Кислотный и основной факторы роста фибробластов, aFGF и bFGF, соответственно, являются гепаринсвязывающими белковыми митогенами, которые, как полагают, играют важную роль в ангиогенезе. Существуют 22 различных FGF и четыре различных тирозинкиназных рецептора (FGFR). FGF и его рецепторы рассмотрены в Presta et al.,
5 *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*, Cytokine Growth Factor Rev., 16 (2005), pp. 159-178, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

В настоящей заявке «FGF» относится к aFGF или bFGF из любого вида и включает их изоформы, фрагменты, варианты или гомологи. Например, FGF может представлять собой: FGF1 (AAH32697.1 GI: 21595687), FGF2 (P09038.3 GI: 261260095), FGF3 (P11487.1 GI: 122748), FGF4 (NP_001998.1 GI: 4503701), FGF5 (P12034.4 GI: 85700417), FGF6 (P10767.4 GI: 1169676), FGF7 (P21781.1 GI: 122756), FGF8 (NP_001193318.1 GI: 329755303), FGF9 (NP_002001.1 GI: 4503707), FGF10 (CAG46466.1 GI: 49456291), FGF11 (Q92914.1 GI: 2494457), FGF12 (P61328.1 GI: 47117683), FGF13 (Q92913.1 GI: 2494461),
10 FGF14 (NP_001308867.1 GI: 1013165743), FGF15 (AAO13811.1 GI: 27448228), FGF16 (NP_003859.1 GI: 4503691), FGF17 (AAQ89228.1 GI: 37182856), FGF18 (AAQ89954.1 GI: 37222209), FGF19 (NP_005108.1 GI: 4826726), FGF20 (AAH98339.1 GI: 68226699), FGF21 (AAQ89444.1 GI: 37183289) или FGF22 (Q9HCT0.1 GI: 13626689), или их изоформы, фрагменты, варианты или гомологи. «Рецептор FGF» относится к полипептиду или
15 полипептидному комплексу, способному связывать FGF, а также его изоформы, фрагменты, варианты или гомологи. Рецепторы FGF включают FGFR1 (AAH15035.1 GI: 21955340), FGFR2 (AAA61188.1 GI: 3397110), FGFR3 (P22607.1 GI: 120050) и FGFR4 (AAH11847.1 GI: 15080148), а также их изоформы, фрагменты или гомологи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор FGF способен
20 связывать FGF и индуцировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор FGF.

Тромбоцитарный фактор роста

Тромбоцитарный фактор роста (PDGF) первоначально был очищен из тромбоцитов, а затем был идентифицирован в фибробластах, астроцитах, кератиноцитах, эпителиальных
30 клетках и других типах клеток. PDGF существуют в виде гетеродимеров (PDGF-AB) или гомодимеров (PDGF-AA или -BB), состоящих из цепей А (P04085.1 GI: 129719) и В (CAG46606.1 GI: 49456571). Существуют две формы PDGF-R, альфа (P16234.1 GI: 129892) и бета (P09619.1 GI: 129890), каждая из которых кодируется различным геном. В зависимости от того, какой фактор роста связан, PDGF-R гомо- или гетеродимеризуется.
35 PDGF и его рецепторы описаны в Ross et al, *The Biology of Platelet-Derived Growth Factor*,

Cell, Vol. 46, 155-169. July 18, 1986, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

В настоящей заявке «PDGF» относится к PDGF-A, PDGF-B, PDGF-AB, PDGF-AA, PDGF-BA или PDGF-BB из любого вида и включает их изоформы, фрагменты, варианты или гомологи. «Рецептор PDGF» относится к полипептиду или полипептидному комплексу, способному связывать PDGF, или его изоформы, фрагменты, варианты или гомологи. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор PDGF представляет собой PDGF-R альфа, PDGF-R бета, гомодимер PDGF-R альфа-альфа, гомодимер PDGF-R бета-бета или гетеродимер PDGF-R альфа-бета. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор PDGF способен связывать PDGF и индуцировать передачу сигнала в клетках, экспрессирующих рецептор PDGF.

Другие ангиогенные факторы включают ангиогенин (NP_001091046.1 GI: 148277046), ангиопоэтин (AAD19608.1 GI: 4378598), интегрины (например, выбранные из (NP_001004439.1 GI: 52485853, NP_002194.2 GI: 116295258, NP_002195.1 GI: 4504747, NP_000876.3 GI: 67191027, NP_002196.4 GI: 1017029567, NP_001303235.1 GI: 937834186, NP_001138468.1 GI: 222418613, NP_003629.2 GI: 612407851, NP_002198.2 GI: 52485941, NP_001273304.1 GI: 556503454, NP_001004439.1 GI: 52485853, NP_001305114.1 GI: 970949440, NP_001273304.1 GI: 556503454, NP_002200.2 GI: 167466215, NP_001139280.1 GI: 224831239, NP_002201.1 GI: 4504763, EAW51597.1 GI: 119571982, NP_001273304.1 GI: 556503454, NP_391988.1 GI: 19743819, NP_001120963.2 GI: 735367803, NP_000203.2 GI: 47078292, NP_000204.3 GI: 54607035, NP_001341694.1 GI: 1269208512, NP_001269282.1 GI: 538916664, NP_000880.1 GI: 4504777, NP_002205.1 GI: 4504779) и TNF α (AQY77150.1 GI: 1159611449). Ингибиторы TNF α , подходящие для применения в настоящем изобретении, включают антитело инфликсимаб.

Фиброз

В настоящей заявке «фиброз» относится к образованию избыточной фиброзной соединительной ткани в результате избыточного отложения компонентов внеклеточного матрикса, например, коллагена.

Фиброзная соединительная ткань характеризуется наличием внеклеточного матрикса (ВКМ) с высоким содержанием коллагена. Коллаген может быть в виде цепей или волокон, которые могут быть расположены нерегулярно или выравнены. ВКМ фиброзной соединительной ткани также может содержать гликозаминогликаны.

В настоящей заявке «избыток фиброзной соединительной ткани» относится к количеству соединительной ткани в конкретном месте (например, в конкретной ткани или органе, или в части конкретной ткани или органа), которое превышает количество

соединительной ткани, присутствующей в этом месте в отсутствие фиброза, например, в нормальных непатологических условиях. В настоящей заявке «избыточное отложение компонентов внеклеточного матрикса» относится к уровню отложения одного или более компонентов внеклеточного матрикса, который превышает уровень отложения в отсутствие фиброза, например, в нормальных непатологических условиях.

Клеточные и молекулярные механизмы фиброза описаны в Wynn, J. Pathol. (2008) 214(2): 199-210 и Wynn and Ramalingam, Nature Medicine (2012) 18:1028-1040, которые тем самым полностью включены посредством ссылки.

Важными клеточными эффекторами фиброза являются миофиibroбласты, которые продуцируют богатый коллагеном внеклеточный матрикс.

В ответ на повреждение ткани поврежденные клетки и лейкоциты продуцируют профиброзные факторы, такие как TGF β , IL-13 и PDGF, которые активируют превращение фибробластов в миофиibroбласты, экспрессирующие α SMA, и привлекают миофиibroбласты к месту повреждения. Миофиibroбласты продуцируют большое количество внеклеточного матрикса и являются важными посредниками, способствующими возникновению контрактуры и закрытию раны. Однако в условиях персистирующей инфекции или во время хронического воспаления может иметь место чрезмерная активация и привлечение миофиibroбластов и, следовательно, чрезмерная продукция компонентов внеклеточного матрикса, что приводит к образованию избыточной фиброзной соединительной ткани.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может быть запущен патологическими состояниями, например, состояниями, инфекциями или патологическими состояниями, которые приводят к выработке профиброзных факторов, таких как TGF β 1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может быть вызван физическим повреждением/стимулами, химическим повреждением/стимулами или повреждением/стимулами, вызванными внешними условиями. Физическое повреждение/стимулы могут возникнуть во время операции, например, ятрогенные причины. Химическое повреждение/стимулы могут включать фиброз, индуцированный лекарственными средствами, например, после длительного введения лекарственных средств, таких как блеомицин, циклофосфамид, амиодарон, прокаинамид, пеницилламин, золото и нитрофурантоин (Daba et al., Saudi Med J 2004 Jun; 25(6): 700-6). Повреждение/стимулы, вызванные внешними условиями, могут включать воздействие волокон асбеста или кремнезема.

Фиброз может возникнуть во многих тканях тела. Например, фиброз может возникнуть в печени (например, цирроз), легких, почке, сердце, кровеносных сосудах,

глазу, коже, поджелудочной железе, кишечнике, головном мозге и костном мозге. Фиброз также может возникнуть в нескольких органах одновременно.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать орган желудочно-кишечной системы, например, печень, тонкий кишечник, толстый кишечник или поджелудочную железу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать орган дыхательной системы, например, легкие. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать орган сердечно-сосудистой системы, например, сердце или кровеносные сосуды. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать кожу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать орган нервной системы, например, головной мозг. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать орган мочевыделительной системы, например, почки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может поражать орган опорно-двигательного аппарата, например, мышечную ткань.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может представлять собой фиброз сердца или миокарда, фиброз печени или фиброз почек. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз сердца или миокарда ассоциирован с дисфункцией мышечной ткани или электрических свойств сердца или утолщением стенок клапанов сердца. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз локализован в предсердии и/или желудочках сердца. Лечение или предотвращение фиброза предсердий или желудочков может помочь уменьшить риск или манифестацию фибрилляции предсердий, фибрилляции желудочков или инфаркта миокарда. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз печени ассоциирован с хроническим заболеванием печени или циррозом печени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз почек ассоциирован с хроническим заболеванием почек.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фиброз может быть ассоциирован с ангиогенезом. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы лечения или предотвращения фиброза, способы определения пригодности субъекта для такого лечения/предотвращения и способов диагностики/прогнозирования фиброза, описанные в настоящей заявке, также применимы к лечению/предотвращению/диагностике/прогнозированию ангиогенеза, и наоборот.

Заболевания/состояния, характеризующиеся фиброзом в соответствии с настоящим изобретением, включают, но не ограничиваются ими: заболевания глаза, такие как

офтальмопатия Грейва, эпиретинальный фиброз, ретинальный фиброз, идиопатический премакулярный фиброз, субретинальный фиброз (например, ассоциированный с отслоением сетчатки или дегенерацией желтого пятна (например, влажной возрастной дегенерацией желтого пятна (AMD))), хориоидальная неоваскуляризация (CNV),
5 диабетическая ретинопатия, глаукома, географическая атрофия (сухая возрастная дегенерация желтого пятна (AMD)), фиброз роговицы, послеоперационный фиброз (например, задней капсулы после операции по удалению катаракты или фильтрационной подушки после трабекулэктомии при глаукоме), конъюнктивальный фиброз или субконъюнктивальный фиброз; респираторные заболевания, такие как фиброз легких, муковисцидоз, идиопатический фиброз легких, прогрессирующий обширный фиброз, склеродермия, облитерирующий бронхолит, синдром Германски-Пудлака, асбестоз, силикоз, хроническая легочная гипертензия, СПИД-ассоциированная легочная гипертензия, саркоидоз, опухолевая строма при заболевании легких, а также астма; хроническое заболевание печени, первичный билиарный цирроз (ПБЦ), шистосомное
10 заболевание печени, цирроз печени; сердечно-сосудистые состояния, такие как гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), фиброз предсердия, фибрилляция предсердий, фиброз желудочка, фибрилляция желудочков, фиброз миокарда, синдром Бругада, миокардит, фиброз эндомикарда, инфаркт миокарда, фиброзное заболевание сосудов, гипертоническая болезнь сердца, аритмогенная кардиомиопатия правого желудочка (ARVC), тубулоинтерстициальный и гломерулярный фиброз, атеросклероз, варикозное расширение вен, церебральные инфаркты; неврологические состояния, такие как глиоз и болезнь Альцгеймера; мышечную дистрофию, такую как мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) или мышечная дистрофия Беккера (BMD); желудочно-кишечные состояния, такие как болезнь Крона, микроскопический колит и первичный склерозирующий холангит (ПСХ); кожные
25 состояния, такие как склеродермия, нефрогенный системный фиброз и келоид кожи; артрофиброз; контрактуру Дюпюитрена; фиброз средостения; забрюшинный фиброз; миелофиброз; болезнь Пейрони; спаечный капсулит; заболевание почек (например, почечный фиброз, нефритический синдром, синдром Альпорта, ВИЧ-ассоциированную нефропатию, поликистоз почек, болезнь Фабри, диабетическую нефропатию, хронический гломерулонефрит, нефрит, ассоциированный с системной волчанкой); прогрессирующий системный склероз (ПСС); хроническую болезнь «трансплантат против хозяина»; артрит; фиброзное преднеопластическое и фиброзное неопластическое заболевание; и фиброз, индуцированный химическим повреждением или повреждением,

вызванным внешними условиями (например, химиотерапией рака, пестицидами, облучением/лучевой терапией рака).

Следует понимать, что многие из перечисленных выше заболеваний/состояний взаимосвязаны. Например, фиброз желудочка может возникнуть после инфаркта миокарда и связан с ДКМП, ГКМП и миокардитом.

Фиброз глаза

Согласно некоторым вариантам реализации настоящее изобретение относится к способам, комбинации для применений в способах или к применению композиции в способах лечения или предотвращения фиброза в глазу. Фиброз глаза подробно описан в Friedlander, *Fibrosis and diseases of the eye*, J Clin Invest. 2007 Mar 1; 117(3): 576–586, которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Фиброз глаза может возникнуть в результате механической раны или различных метаболических нарушений, включая ответы на воспаление, ишемии и дегенеративного заболевания. Фиброз глаза может относиться к заживлению ран или патологическим явлениям в переднем сегменте глаза или в заднем (т. е. ретинальном) сегменте глаза.

Фиброз глаза может представлять собой ретинальный, эпиретинальный или субретинальный фиброз. Он может возникнуть в результате ишемической ретинопатии или может быть ассоциирован с ней. Фиброз глаза может представлять собой фиброз, ассоциированный с ишемией и/или неоваскуляризацией на поверхности сетчатки. Фиброз глаза может быть ассоциирован с субретинальной неоваскуляризацией, например, неоваскуляризацией, происходящей из хориокапилляров. Фиброз может быть ассоциирован с сосудисто-фиброзным рубцеванием, например, сетчатки. Фиброз глаза может быть ассоциирован с хориоидальной неоваскуляризацией (CNV).

Фиброз глаза также может возникнуть в переднем сегменте глаза. Например, фиброз может поражать роговицу или трабекулярную сеть (пути, через которые внутриглазная жидкость выходит из глаза). Фиброз может быть охарактеризован сосудисто-фиброзным ростом на поверхности роговицы, например, пингвекула и птеригиум.

Фиброз глаза может быть ассоциирован с заболеванием/нарушением, таким как воспалительное или ишемическое нарушение. Такие заболевания/нарушения включают офтальмопатию Грейва, эпиретинальный фиброз, ретинальный фиброз, идиопатический премакулярный фиброз, субретинальный фиброз (например, ассоциированный с отслойкой сетчатки или дегенерацией желтого пятна (например, влажной возрастной дегенерацией желтого пятна (AMD)), диабетическую ретинопатию, глаукому, географическую атрофию (сухую возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD)), фиброз роговицы, послеоперационный фиброз (например, задней капсулы после операции

по удалению катаракты или фильтрационной подушки после трабекулэктомии при глаукоме), конъюнктивальный фиброз или субконъюнктивальный фиброз.

Лечение, предотвращение или облегчение фиброза в соответствии с настоящим изобретением может относиться к фиброзу, который ассоциирован с положительной регуляцией IL-11, например, положительной регуляцией IL-11 в клетках или ткани, в которых фиброз возник или может возникнуть, или положительной регуляцией внеклеточного IL-11 или IL-11R.

Лечение или облегчение фиброза может быть эффективным для предотвращения прогрессирования фиброза, например, для предотвращения ухудшения состояния или для замедления скорости развития фиброза. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лечение или облегчение может привести к улучшению при фиброзе, например, уменьшению количества отложившихся коллагеновых волокон.

Предотвращение фиброза может относиться к предотвращению ухудшения состояния или предотвращению развития фиброза, например, предотвращению прогрессирования ранней стадии фиброза в более позднюю, хроническую, стадию.

Антагонисты передачи сигнала IL-11

Аспекты настоящего изобретения включают антагонистическое действие (т. е. ингибирование) на опосредуемую IL-11 передачу сигнала.

В настоящей заявке «ингибирование» относится к уменьшению, снижению или убавлению по сравнению с контрольным условием. Например, ингибирование действия IL-11 антагонистом опосредуемой IL-11 передачи сигнала относится к уменьшению, снижению или убавлению интенсивности/степени опосредуемой IL-11 передачи сигнала в отсутствие агента и/или в присутствии соответствующего контрольного агента.

В настоящей заявке ингибирование также может называться нейтрализацией или антагонистическим действием. Об антагонисте опосредуемой IL-11 передачи сигнала (например, антагонисте активности, опосредуемой IL-11 или IL-11-содержащим комплексом) можно сказать, что он является «нейтрализующим» или «антагонистическим» агентом по отношению к соответствующей функции или процессу. Например, агент, который способен ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала, можно называть агентом, который способен нейтрализовать опосредуемую IL-11 передачу сигнала, или можно называть антагонистом опосредуемой IL-11 передачи сигнала.

Путь передачи сигнала IL-11 обеспечивает несколько путей ингибирования передачи сигнала IL-11. Антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала может ингибировать действие IL-11, например, посредством ингибирования действия одного или более

факторов, участвующих или необходимых для передачи сигнала посредством рецептора IL-11.

Например, ингибирование передачи сигнала IL-11 может быть достигнуто путем нарушения взаимодействия между IL-11 (или комплексом, содержащим IL-11, например, комплексом IL-11 и IL-11R α) и рецептором IL-11 (например, IL-11R α , рецепторным комплексом, содержащим IL-11R α , gp130 или рецепторным комплексом, содержащим IL-11R α и gp130). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала достигается путем ингибирования экспрессии гена или белка одного или более, например, из IL-11, IL-11R α и gp130.

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала достигается путем нарушения опосредуемой IL-11 *цис*-передачи сигнала, но без нарушения опосредуемой IL-11 *транс*-передачи сигнала, например, ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала достигается путем ингибирования опосредуемых gp130 *цис*-комплексов с участием связанного с мембраной IL-11R α . Согласно вариантам реализации настоящего изобретения ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала достигается путем нарушения опосредуемой IL-11 *транс*-передачи сигнала, но без нарушения опосредуемой IL-11 *цис*-передачи сигнала, то есть ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала достигается путем ингибирования комплексов опосредуемой gp130 *транс*-передачи сигнала, таких как IL-11, связанный с растворимым IL-11R α , или IL-6, связанный с растворимым IL-6R. Согласно вариантам реализации настоящего изобретения ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала достигается путем нарушения опосредуемой IL-11 *цис*-передачи сигнала и опосредуемой IL-11 *транс*-передачи сигнала. Любой агент, описанный в настоящей заявке, можно применять для ингибирования опосредуемой IL-11 *цис*- и/или *транс*-передачи сигнала.

В других примерах ингибирование передачи сигнала IL-11 может быть достигнуто путем нарушения путей передачи сигнала после IL-11/IL-11R α /gp130.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в способах согласно настоящему изобретению применяют агенты, способные ингибировать передачу сигнала JAK/STAT. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать передачу сигнала JAK/STAT, способны ингибировать действие JAK1, JAK2, JAK3, TYK2, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B и/или STAT6. Например, агенты могут быть способны ингибировать активацию белков JAK/STAT, ингибировать взаимодействие белков JAK или STAT с рецепторами поверхности клетки, например, IL-11R α или gp130, ингибировать фосфорилирование

белков JAK, ингибировать взаимодействие между белками JAK и STAT, ингибировать фосфорилирование белков STAT, ингибировать димеризацию белков STAT, ингибировать транслокацию белков STAT в ядро клетки, ингибировать связывание белков STAT с ДНК и/или стимулировать разрушение белков JAK и/или STAT. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор JAK/STAT выбран из руксолитиниба (джакафи/джакави; Incyte), тофацитиниба (ксельянз/джаквинус; NIN/Pfizer), оклацитиниба (апокел), барицитиниба (олумиант; Incyte/Eli Lilly), филготииниба (G-146034/GLPG-0634; Galapagos NV), гандотииниба (LY-2784544; Eli Lilly), лестауртиниба (CEP-701; Teva), момелотииниба (GS-0387/CYT-387; Gilead Sciences), пакритиниба (SB1518; CTI), PF-04965842 (Pfizer), упадацитиниба (ABT-494; AbbVie), пефидитиниба (ASP015K/JNJ-54781532; Astellas), федратиниба (SAR302503; Celgene), кукурбитацина I (JSI-124) и CHZ868.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в способах согласно настоящему изобретению применяют агенты, способные ингибировать передачу сигнала MAPK/ERK. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать передачу сигнала MAPK/ERK, способны ингибировать ERK p42/44. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор ERK выбран из SCH772984, SC1, VX-11e и DEL-22379. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать передачу сигнала MAPK/ERK, способны ингибировать действие GRB2, ингибировать действие киназы RAF, ингибировать действие белков MEK, ингибировать активацию MAP3K/MAP2K/MAPK и/или Мус и/или ингибировать фосфорилирование белков STAT. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибитор ERK выбран из сорафениба (нексавар; Bayer/Onyx), SB590885, PLX4720, XL281, RAF265 (Novartis), энкорафениба (LGX818/брафтови; Array BioPharma), дабрафениба (тафинлар; GSK), вемурафениба (зелбораф; Roche), кобиметиниба (котеллик; Roche), CI-1040, PD0325901, биниметиниба (MEK162/MEKTOVI; Array BioPharma), селуметиниба (AZD6244; Array/AstraZeneca) и траметиниба (GSK1120212/мекинист; Novartis).

Связывающие агенты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала, могут связываться с IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала, могут связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R α , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R α и/или gp130). Связывание таких агентов может ингибировать опосредуемую IL-11 передачу

сигнала путем уменьшения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, что ингибирует последующую передачу сигнала. Связывание таких агентов может ингибировать опосредуемую IL-11 *цис*- и/или *транс*-передачу сигнала путем уменьшения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, например, IL-11R α и/или gp130, что ингибирует последующую передачу сигнала. Агенты могут связываться с комплексами *транс*-передачи сигнала, такими как IL-11 и растворимый IL-11R α , и ингибировать опосредуемую gp130 передачу сигнала.

Агенты, способные связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11 могут быть любого типа, но согласно некоторым вариантам реализации агент может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, пептид, нуклеиновую кислоту, олигонуклеотид, аптамер или малую молекулу. Агенты могут быть обеспечены в выделенной или очищенной форме или могут быть изготовлены в виде фармацевтической композиции или лекарственного средства.

Свойства IL-11-связывающих агентов

Агенты, способные связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11 согласно настоящему изобретению, могут проявлять одно или более из следующих свойств:

- Специфичное связывание с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11;
- Связывание с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11 с K_D 10 мкМ или менее, предпочтительно одно из ≤ 5 мкМ, ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 100 пМ;
- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и IL-11R α ;
- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и gp130;
- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и рецепторным комплексом IL-11R α :gp130;
- Ингибирование взаимодействия между комплексом IL-11:IL-11R α и gp130;
- Ингибирование взаимодействия между IL-11 и IL-11.

Эти свойства могут быть определены путем исследования соответствующего агента в подходящем анализе, который может включать сравнение эффективности агента с подходящими контрольными агентами. Квалифицированный специалист может определить подходящие контрольные условия для конкретного анализа.

Например, подходящий отрицательный контроль для исследования способности тестируемого антитела/антигенсвязывающего фрагмента связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом/рецептором IL-11, может представлять собой

антитело/антигенсвязывающий фрагмент, направленный против нецелевого белка (т. е. антитело/антигенсвязывающий фрагмент, которое (ый) не является специфичным в отношении IL-11/IL-11-содержащего комплекса/рецептора IL-11). Подходящий положительный контроль может представлять собой известное подтвержденное (например, доступное коммерчески) антитело, связывающее IL-11 или рецептор IL-11. Контроли могут быть того же изотипа, что и предполагаемое антитело/антигенсвязывающий фрагмент, связывающие IL-11/IL-11-содержащий комплекс/рецептор IL-11, и могут иметь, например, такие же константные области.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен специфично связываться с IL-11 или IL-11-содержащим комплексом, или рецептором IL-11 (например, IL-11R α , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R α и/или gp130). Агент, который специфично связывается с конкретной молекулой-мишенью, предпочтительно связывает мишень с большей аффинностью и/или с большей продолжительностью, чем он связывается с другими нецелевыми молекулами.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может связываться с IL-11 или IL-11-содержащим комплексом с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более другими представителями семейства цитокинов IL-6 (например, IL-6, фактором ингибирования лейкоза (LIF), онкостатином M (OSM), кардиотропином-1 (CT-1), цилиарным нейротрофическим фактором (CNTF) и кардиотропиноподобным цитокином (CLC)). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может связываться с рецептором IL-11 (например, IL-11R α , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R α и/или gp130) с большей аффинностью, чем аффинность связывания с одним или более другими представителями семейства рецепторов IL-6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может связываться с большей аффинностью с IL-11R α , чем аффинность связывания с одним или более из IL-6R α , рецептора фактора ингибирования лейкоза (LIFR), рецептора онкостатина M (OSMR) и альфа-рецептора цилиарного нейротрофического фактора (CNTFR α).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения степень связывания связывающего агента с нецелевой молекулой составляет менее примерно 10% от связывания агента с мишенью, согласно результатам измерения, например, с помощью ИФА, SPR, интерферометрии биослоя (BLI), маломасштабного термофореза (MST) или радиоиммуноанализа (РИА). В качестве альтернативы, специфичность связывания может быть представлена как аффинность связывания, когда связывающий агент связывается с IL-11, IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11 с K_D , которая по меньшей

мере на $0,1$ порядка величины (т. е. $0,1 \times 10^n$, где n это целое число, представляющее порядок величины) превышает K_D в отношении другой нецелевой молекулы. Это необязательно может быть одно из по меньшей мере $0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5$ или $2,0$.

5 Аффинность связывания конкретного связывающего агента в отношении его мишени часто описывают как его константу диссоциации (K_D). Аффинность связывания может быть измерена с помощью способов, известных в данной области техники, таких как ИФА, поверхностный плазмонный резонанс (SPR; см., например, Hearty et al., *Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442; или Rich et al., *Anal Biochem.* 2008 Feb 1; 373(1):112-20),
10 интерферометрия биослоя (см. например, Lad et al., (2015) *J Biomol Screen* 20(4): 498-507; или Concepcion et al., *Comb Chem High Throughput Screen.* 2009 Sep; 12(8):791-800), исследование методом маломасштабного термофореза (MST) (см. например, Jerabek-Willemsen et al., *Assay Drug Dev Technol.* 2011 Aug; 9(4): 342–353), или с помощью анализа связывания антигена с радиоактивной меткой (РИА).

15 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен связываться с IL-11 или IL-11-содержащим комплексом, или рецептором IL-11 с K_D 50 мкМ или менее, предпочтительно одно из ≤ 10 мкМ, ≤ 5 мкМ, ≤ 4 мкМ, ≤ 3 мкМ, ≤ 2 мкМ, ≤ 1 мкМ, ≤ 500 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 75 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 40 нМ, ≤ 30 нМ, ≤ 20 нМ, ≤ 15 нМ, $\leq 12,5$ нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 9 нМ, ≤ 8 нМ, ≤ 7 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 500 пМ,
20 ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ или ≤ 100 пМ.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент связывается с IL-11, IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11 с аффинностью связывания (например, определенной с помощью ИФА) $ЭК_{50} = 10000$ нг/мл или менее, предпочтительно одно из ≤ 5000 нг/мл, ≤ 1000 нг/мл, ≤ 900 нг/мл, ≤ 800 нг/мл,
25 ≤ 700 нг/мл, ≤ 600 нг/мл, ≤ 500 нг/мл, ≤ 400 нг/мл, ≤ 300 нг/мл, ≤ 200 нг/мл, ≤ 100 нг/мл, ≤ 90 нг/мл, ≤ 80 нг/мл, ≤ 70 нг/мл, ≤ 60 нг/мл, ≤ 50 нг/мл, ≤ 40 нг/мл, ≤ 30 нг/мл, ≤ 20 нг/мл, ≤ 15 нг/мл, ≤ 10 нг/мл, $\leq 7,5$ нг/мл, ≤ 5 нг/мл, $\leq 2,5$ нг/мл или ≤ 1 нг/мл. Такие ИФА могут быть выполнены, например, как описано в *Antibody Engineering*, vol. 1 (2 изд.), Springer Protocols, Springer (2010), Part V, pp657-665.

30 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент связывается с IL-11 или IL-11-содержащим комплексом в области, которая важна для связывания с рецептором IL-11 или IL-11-содержащим комплексом, например, gp130 или IL-11R α , и посредством этого ингибирует взаимодействие между IL-11 или IL-11-содержащим комплексом и рецептором IL-11 и/или передачу сигнала посредством
35 рецептора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент

связывается с рецептором IL-11 в области, которая важна для связывания с IL-11 или IL-11-содержащим комплексом, и посредством этого ингибирует взаимодействие между IL-11 или IL-11-содержащим комплексом и рецептором IL-11 и/или передачу сигнала посредством рецептора.

5 Способность конкретного связывающего агента (например, агента, способного связывать IL-11/IL-11-содержащий комплекс или рецептор IL-11) ингибировать взаимодействие между двумя белками, может быть определена, например, путем исследования взаимодействия в присутствии связывающего агента, или после инкубации одного или обоих партнеров по взаимодействию с ним. Примером подходящего анализа
10 для определения того, способен ли конкретный связывающий агент ингибировать взаимодействие между двумя партнерами по взаимодействию, является конкурентный ИФА.

Связывающий агент, который способен ингибировать конкретное взаимодействие (например, между IL-11 и IL-11R α или между IL-11 и gp130, или между IL-11 и IL-11R α :gp130, или между IL-11:IL-11R α и gp130), идентифицируют на основании
15 наблюдения уменьшения/снижения уровня взаимодействия между партнерами по взаимодействию в присутствии связывающего агента, или после инкубации одного или обоих партнеров по взаимодействию с ним, по сравнению с уровнем взаимодействия в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного
20 связывающего агента). Подходящее исследование может быть выполнено *in vitro*, например, с использованием рекомбинантных партнеров по взаимодействию или с использованием клеток, экспрессирующих партнеров по взаимодействию. Клетки могут экспрессировать партнеров по взаимодействию эндогенно или с нуклеиновой кислоты, введенной в клетку. Для целей таких анализов один или оба партнера по взаимодействию
25 и/или связывающий агент могут быть помечены или могут использоваться вместе с обнаруживаемой частицей для целей обнаружения и/или измерения уровня взаимодействия. Например, агент может быть помечен радиоактивным атомом или окрашенной молекулой, или флуоресцентной молекулой, или молекулой, которую можно легко обнаружить любым другим путем. Подходящие обнаруживаемые молекулы
30 включают флуоресцентные белки, люциферазу, субстраты ферментов и радиоактивные метки. Связывающий агент может быть непосредственно помечен обнаруживаемой меткой или может быть помечен опосредовано. Например, связывающий агент может не содержать метку и может быть обнаружен с помощью другого связывающего агента, который сам помечен. В качестве альтернативы, второй связывающий агент может

содержать связанный с ним биотин, а связывание меченого стрептавидина с биотином можно использовать для опосредованного мечения первого связывающего агента.

Способность связывающего агента ингибировать взаимодействие между двумя партнерами по связыванию также может быть определена путем исследования последующих функциональных последствий такого взаимодействия, например, опосредуемой IL-11 передачи сигнала. Например, последующие функциональные последствия взаимодействия между IL-11 и IL-11R α :gp130 или между IL-11:IL-11R α и gp130 могут включать, например, процесс, опосредуемый IL-11, образование миофибробластов из фибробластов, пролиферацию или миграцию секреторных клеток гладких мышц (SMC) или экспрессию гена/белка, например, коллагена или IL-11.

Способность связывающего агента ингибировать взаимодействие между IL-11 или IL-11-содержащим комплексом и рецептором IL-11 может быть исследована, например, путем стимуляции фибробластов с применением TGF β 1, инкубации клеток в присутствии связывающего агента и исследования доли клеток, имеющих α SMA-положительный фенотип, спустя определенный период времени. В таких примерах ингибирование взаимодействия между IL-11 или IL-11-содержащим комплексом и рецептором IL-11 может быть идентифицировано на основании наблюдения более низкой доли клеток, имеющих α SMA-положительный фенотип, по сравнению с положительным контрольным условием, при котором клетки обрабатывают TGF β 1 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента) или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента. Такие анализы также подходят для исследования способности связывающего агента ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала. Ингибирование взаимодействия между IL-11 или IL-11-содержащим комплексом и рецептором IL-11 также можно исследовать с использованием анализов включения ³H-тимидина и/или пролиферации клеток Ba/F3, таких как те, которые описаны, например, в Curtis et al. Blood, 1997, 90(11) и Karpovich et al. Mol. Hum. Reprod. 2003 9(2): 75-80. Клетки Ba/F3 совместно экспрессируют IL-11R α и gp130.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11R α до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11R α в отсутствие

связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11Rα менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11Rα в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и gp130 до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня взаимодействия между IL-11 и gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и gp130 менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня взаимодействия между IL-11 и gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11Rα:gp130 до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11Rα:gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11Rα:gp130 менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$

раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11R α :gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между комплексом IL-11:IL-11R α и gp130 до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня взаимодействия между комплексом IL-11:IL-11R α и gp130 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент способен ингибировать взаимодействие между комплексом IL-11:IL-11R α и gp130 менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня взаимодействия между комплексом IL-11:IL-11R α и gp130 в отсутствие связывающего агента.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11 до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11 в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент способен ингибировать взаимодействие между IL-11 и IL-11 менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня взаимодействия между IL-11 и IL-11 в отсутствие связывающего агента.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11,

представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11, представляет собой полипептид, например, молекулу рецептора-ловушки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11, может представлять собой аптамер.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела, способные связываться с IL-11, включают, например, клон моноклонального мышинового антитела к IL-11 человека №22626; № по каталогу MAB218 (R&D Systems, Миннесота, США), использованный, например, в Bockhorn et al. Nat. Commun. (2013) 4(0):1393, клон 6D9A (Abbiotec), клон KT8 (Abbiotec), клон M3103F11 (BioLegend), клон 1F1 (Abnova Corporation), клон 3C6 (Abnova Corporation), клон GF1 (LifeSpan Biosciences), клон 13455 (Source BioScience) и антитела к IL-11, раскрытые в US 2009/0202533 A1, WO 99/59608 A2 и WO 2018/109174 A2.

Антитела, способные связываться с IL-11R α , включают, например, клон моноклонального антитела 025 (Sino Biological), клон EPR5446 (Abcam), клон 473143 (R&D Systems), клоны 8E2 и 8E4, описанные в US 2014/0219919 A1, моноклональные антитела, описанные в Blanc et al (J. Immunol Methods. 2000 Jul 31;241(1-2);43-59), антитела, раскрытые в WO 2014121325 A1 и US 2013/0302277 A1, и антитела к IL-11R α , раскрытые в US 2009/0202533 A1, WO 99/59608 A2 и WO 2018/109170 A2.

Антитела/фрагменты могут представлять собой антагонистические антитела/фрагменты, которые ингибируют или уменьшают биологическую активность IL-11. Антитела/фрагменты могут представлять собой нейтрализующие антитела, которые нейтрализуют биологический эффект IL-11, например, его способность стимулировать эффективную передачу сигнала за счет рецептора IL-11. Нейтрализующая активность может быть измерена по способности нейтрализовать IL-11-индуцированную пролиферацию в линии клеток плазмацитомы мыши T11 (Nordan, R. P. et al. (1987) J. Immunol. 139:813).

Рецепторы-ловушки

Агенты на основе пептидов или полипептидов, способные связываться с IL-11 или IL-11-содержащими комплексами, могут быть основаны на рецепторе IL-11, например, на IL-11-связывающем фрагменте рецептора IL-11.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может содержать IL-11-связывающий фрагмент цепи IL-11R α и предпочтительно может быть растворимым и/или может не содержать один или более, или все, из трансмембранных доменов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может содержать IL-11-связывающий фрагмент gp130 и предпочтительно может быть растворимым и/или может не содержать один или более, или все, из трансмембранных доменов. Такие молекулы могут быть описаны как рецепторы-ловушки. Связывание таких агентов может ингибировать опосредуемую IL-11 *цис*- и/или *транс*-передачу сигнала путем уменьшения/предотвращения способности IL-11 связываться с рецепторами IL-11, например, IL-11R α или gp130, что ингибирует последующую передачу сигнала.

Curtis et al (Blood 1997 Dec 1;90 (11):4403-12) сообщают, что альфа-цепь растворимого мышинового рецептора IL-11 (sIL-11R) была способна оказывать антагонистическое действие на активность IL-11 при тестировании на клетках, экспрессирующих трансмембранный IL-11R и gp130. Они предположили, что наблюдаемое антагонистическое действие sIL-11R на IL-11 зависит от ограниченного количества молекул gp130 на клетках, уже экспрессирующих трансмембранный IL-11R.

Также сообщалось о применении растворимых рецепторов-ловушек в качестве основы для ингибирования передачи сигнала и терапевтического вмешательства для других пар сигнальная молекула:рецептор, например, VEGF и рецептор VEGF (De-Chao Yu et al., Molecular Therapy (2012); 20 5, 938-947; Konner and Dupont Clin Colorectal Cancer 2004 Oct;4 Suppl 2:S81-5).

Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может представлять собой рецептор-ловушку, например, растворимый рецептор IL-11 и/или IL-11-содержащих комплексов. Сообщалось, что конкуренция за IL-11 и/или IL-11-содержащие комплексы, обеспечиваемая рецептором-ловушкой, приводит к антагонистическому действию на IL-11 (Curtis et al., выше). Рецепторы-ловушки IL-11 также описаны в WO 2017/103108 A1 и WO 2018/109168 A1, которые тем самым полностью включены посредством ссылки.

Рецепторы-ловушки IL-11 предпочтительно связывают IL-11 и/или IL-11-содержащие комплексы и посредством этого делают эти молекулы недоступными для связывания с рецепторами gp130, IL-11R α и/или gp130:IL-11R α . Таким образом, они действуют как рецепторы-ловушки IL-11 и/или IL-11-содержащих комплексов путем, который в значительной степени аналогичен действию этанерцепта в качестве рецептора-

ловушки для TNF α . Опосредуемая IL-11 передача сигналов уменьшается по сравнению с уровнем передачи сигнала в отсутствие рецептора-ловушки.

Рецепторы-ловушки IL-11 предпочтительно связываются с IL-11 посредством одного или более модулей связывания цитокинов (CBM). CBM представляют собой или происходят, или гомологичны CBM из природных рецепторных молекул IL-11. Например, рецепторы-ловушки IL-11 могут содержать или состоять из одного или более CBM, которые получены или происходят, или гомологичны CBM gp130 и/или IL-11R α .

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор-ловушка IL-11 может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, соответствующей модулю связывания цитокинов gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор-ловушка IL-11 может содержать аминокислотную последовательность, соответствующую модулю связывания цитокинов IL-11R α . В настоящей заявке аминокислотная последовательность, которая «соответствует» эталонной области или последовательности конкретного пептида/полипептида, имеет по меньшей мере 60%, например, одно из по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью эталонной области/последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор-ловушка может быть способен связывать IL-11, например, с аффинностью связывания по меньшей мере 100 мкМ или менее, необязательно одно из 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее или примерно от 1 до 100 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор-ловушка может содержать весь или часть IL-11-связывающего домена и необязательно в нем могут отсутствовать все или часть из трансмембранных доменов. Рецептор-ловушка необязательно может быть гибридизован с константной областью иммуноглобулина, например, областью Fc IgG.

Ингибиторы

Согласно настоящему изобретению предусмотрено применение ингибирующих молекул, способных связываться с одним или более из IL-11, IL-11-содержащего комплекса, IL-11R α , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R α и/или gp130, и ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой связывающий агент на основе пептида или полипептида, основанный на IL-11, например, мутант, вариант или связывающий фрагмент IL-11. Подходящие агенты на основе пептида или полипептида могут связываться с рецептором IL-11

(например, IL-11R α , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R α и/или gp130) таким образом, который не приводит к инициации передачи сигнала или который приводит к субоптимальной передаче сигнала. Мутанты IL-11 такого типа могут действовать как конкурентные ингибиторы эндогенного IL-11.

5 Например, W147A представляет собой антагонист IL-11, в котором аминокислота 147 мутирована с заменой триптофана аланином, который разрушает так называемый «сайт III» IL-11. Этот мутант может связываться с IL-11R α , но не способен захватывать гомодимер gp130, что приводит к эффективной блокаде передачи сигнала IL-11 (Underhill-Day et al., 2003; Endocrinology 2003 Aug;144(8):3406-14). Lee et al (Am J respire
10 Cell Mol Biol. 2008 Dec; 39(6):739-746) также сообщают о получении мутанта антагониста IL-11 («мутеина»), способного специфично ингибировать связывание IL-11 с IL-11R α . Мутеины IL-11 также описаны в WO 2009/052588 A1.

Menkhorst et al (Biology of Reproduction May 1, 2009 vol.80 no.5 920-927) описывают пегилированный антагонист IL-11, PEGIL11A (CSL Limited, Парквилл, Виктория,
15 Австралия), который эффективно ингибирует действие IL-11 у самок мышей.

Pasqualini et al. Cancer (2015) 121(14):2411-2421 описывают направленное лигандом пептидомиметическое лекарственное средство, нацеленный на метастазы в кости пептидомиметик-11 (BMTP-11), способный связываться с IL-11R α .

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий
20 агент, способный связываться с рецептором IL-11, может быть обеспечен в виде низкомолекулярного ингибитора одного из IL-11R α , gp130 или комплекса, содержащего IL-11R α и/или gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть обеспечен в виде низкомолекулярного ингибитора IL-11 или IL-11-содержащего комплекса, например, ингибитора IL-11, описанного в Lay et al.,
25 Int. J. Oncol. (2012); 41(2): 759-764, которая тем самым полностью включена посредством ссылки.

Аптамеры

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с IL-11/IL-11-содержащим комплексом или рецептором IL-11
30 (например, IL-11R α , gp130 или комплексом, содержащим IL-11R α и/или gp130), представляет собой аптамер.

Агенты, способные уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11

Согласно аспектам настоящего изобретения может быть обеспечен антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала, способный предотвращать или уменьшать
35 экспрессию одного или более из IL-11, IL-11R α или gp130.

Экспрессия может представлять собой экспрессию гена или белка и может быть определена, как описано в настоящей заявке. Экспрессия может осуществляться клеткой/тканью/органом/системой органов субъекта. Например, экспрессия может быть предотвращена/уменьшена в клетках гладких мышц.

5 Подходящие агенты могут быть любого типа, но согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный предотвращать или уменьшать экспрессию одного или более из IL-11, IL-11R α или gp130, может представлять собой малую молекулу или олигонуклеотид.

Агент, способный предотвращать или уменьшать экспрессию одного или более из
10 IL-11, IL-11R α или gp130, может осуществлять это, например, посредством ингибирования транскрипции гена, кодирующего IL-11, IL-11R α или gp130, ингибирования посттранскрипционного процессинга РНК, кодирующей IL-11, IL-11R α или gp130, уменьшения стабильности РНК, кодирующей IL-11, IL-11R α или gp130, стимуляции разрушения РНК, кодирующей IL-11, IL-11R α или gp130, ингибирования
15 посттрансляционного процессинга полипептида IL-11, IL-11R α или gp130, уменьшения стабильности полипептида IL-11, IL-11R α или gp130 или стимуляции разрушения полипептида IL-11, IL-11R α или gp130.

Taki et al. Clin Exp Immunol (1998) Apr; 112(1): 133-138 сообщили об уменьшении экспрессии IL-11 в ревматоидных синовиальных клетках после лечения индометацином,
20 дексаметазоном или гамма-интерфероном (ИФН- γ).

Согласно настоящему изобретению предусмотрено применение антисмысловой нуклеиновой кислоты для предотвращения/уменьшения экспрессии IL-11, IL-11R α или gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный предотвращать или уменьшать экспрессию IL-11, IL-11R α или gp130, может
25 вызывать уменьшение экспрессии путем РНК-интерференции (РНКи).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может представлять собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, такую как антисмысловая или малая интерферирующая РНК, включая, но не ограничиваясь ими, кшРНК, дцРНК, мкРНК или миРНК.

30 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибирующая нуклеиновая кислота обеспечена в векторе. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может представлять собой лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК для одного или более из IL-11, IL-11R α или gp130.

Принимая во внимание известные последовательности нуклеиновых кислот IL-11,
35 IL-11R α и gp130 (например, известные последовательности иРНК, доступные в GenBank

под номерами доступа: BC012506.1 GI:15341754 (IL-11 человека), BC134354.1 GI:126632002 (IL-11 мыши), AF347935.1 GI:13549072 (IL-11 крысы), NM_001142784.2 GI:391353394 (IL-11R α человека), NM_001163401.1 GI:254281268 (IL-11R α мыши), NM_139116.1 GI:20806172 (IL-11R α крысы), NM_001190981.1 GI:300244534 (gp130 человека), NM_010560.3 GI:225007624 (gp130 мыши), NM_001008725.3 GI:300244570 (gp130 крысы)), олигонуклеотиды могут быть сконструированы для подавления или подавления экспрессии IL-11, IL-11R α или gp130.

Такие олигонуклеотиды могут иметь любую длину, но предпочтительно могут быть короткими, например, менее 100 нуклеотидов, например, 10-40 нуклеотидов или 20-50 нуклеотидов, и могут содержать нуклеотидную последовательность, имеющую полную или почти полную комплементарность (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарность) с последовательностью нуклеотидов соответствующей длины в целевом олигонуклеотиде, например, иРНК IL-11, IL-11R α или gp130. Комплементарная область нуклеотидной последовательности может иметь любую длину, но предпочтительно составляет по меньшей мере 5 и необязательно не более 50 нуклеотидов в длину, например, одно из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

Подавление экспрессии IL-11, IL-11R α или gp130 предпочтительно приведет к снижению количества IL-11, IL-11R α или gp130, экспрессированных клеткой/тканью/органом/системой органов/субъектом. Например, в конкретной клетке подавление IL-11, IL-11R α или gp130 путем введения подходящей нуклеиновой кислоты приведет к снижению количества IL-11, IL-11R α или gp130, экспрессированных этой клеткой, по сравнению с необработанной клеткой. Подавление может быть частичным. Предпочтительная степень подавления составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно одно из по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85% или 90%. Уровень подавления от 90% до 100% считается «подавлением» (silencing) экспрессии или функции.

Другой альтернативой является экспрессия в клетке молекулы короткой шпильчатой РНК (кшРНК). Предпочтительно молекула кшРНК содержит неполную последовательность IL-11, IL-11R α или gp130. Предпочтительно последовательность кшРНК составляет от 40 до 100 оснований в длину, более предпочтительно от 40 до 70 оснований в длину. Стержень шпильки предпочтительно составляет от 19 до 30 пар оснований в длину. Стержень может содержать пары G-U для стабилизации структуры шпильки.

Молекулы миРНК, более длинные молекулы дцРНК или молекулы мкРНК могут быть получены рекомбинантно путем транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, предпочтительно содержащейся в векторе. Предпочтительно молекула миРНК, более длинная молекула дцРНК или молекула мкРНК содержит неполную последовательность IL-11, IL-11R α или gp130.

Согласно одному варианту реализации миРНК, более длинную дцРНК или мкРНК получают эндогенно (внутри клетки) путем транскрипции с вектора. Подходящие векторы могут представлять собой олигонуклеотидные векторы, сконфигурированные для экспрессии олигонуклеотидного агента, способного к подавлению IL-11, IL-11R α или gp130.

Согласно другим вариантам реализации вектор может быть сконфигурирован так, чтобы облегчать доставку терапевтического олигонуклеотида в место, в котором требуется подавление экспрессии IL-11, IL-11R α или gp130.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, которая при введении или экспрессии подходящим образом в клетке млекопитающего, например, человека, которая в ином случае экспрессирует IL-11, IL-11R α или gp130, способна подавлять экспрессию IL-11, IL-11R α или gp130 путем РНКи.

Последовательности нуклеиновых кислот для олигонуклеотидов IL-11, IL-11R α и gp130 (например, известные последовательности иРНК, доступные в GenBank под номерами доступа: BC012506.1 GI:15341754 (IL-11 человека), BC134354.1 GI:126632002 (IL-11 мыши), AF347935.1 GI:13549072 (IL-11 крысы), NM_001142784.2 GI:391353394 (IL-11R α человека), NM_001163401.1 GI:254281268 (IL-11R α мыши), NM_139116.1 GI:20806172 (IL-11R α крысы), NM_001190981.1 GI:300244534 (gp130 человека), NM_010560.3 GI:225007624 (gp130 мыши), NM_001008725.3 GI:300244570 (gp130 крысы)), могут быть сконструированы для подавления или подавления экспрессии IL-11, IL-11R α или gp130.

Нуклеиновая кислота может иметь существенную идентичность последовательности с частью иРНК IL-11, IL-11R α или gp130, например, как определено в GenBank под номером доступа NM_000641.3 GI:391353405 (IL-11), NM_001142784.2 GI:391353394 (IL-11R α), NM_001190981.1 GI:300244534 (gp130), или с последовательностью, комплементарной указанной иРНК.

Нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную миРНК. (Как будет понятно специалисту и как подробно объяснено ниже, молекула миРНК также может содержать короткую 3'-последовательность ДНК.)

В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (обычно двухцепочечную ДНК), которая при транскрибировании в клетке млекопитающего дает РНК, имеющую две комплементарные части, соединенные за счет спейсера так, что РНК принимает форму шпильки, когда комплементарные части гибридируются друг с другом. В клетке млекопитающего структура шпильки может быть отщеплена от молекулы ферментом DICER с получением двух отдельных, но гибридизованных молекул РНК.

Согласно некоторым предпочтительным вариантам реализации нуклеиновая кислота в основном нацелена на последовательность одной из SEQ ID NO с 4 по 7 (IL-11) или одной из SEQ ID NO с 8 по 11 (IL-11R α).

Ожидается, что только одноцепочечные (т. е. несамогибридизованные) области транскрипта иРНК будут подходящими мишенями для РНКи. Таким образом, предполагается, что другие последовательности, очень близкие в транскрипте иРНК IL-11 или IL-11R α к последовательности, представленной одной из SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11, также могут представлять собой подходящие мишени для РНКи. Такие последовательности-мишени предпочтительно составляют 15-21 нуклеотид в длину и предпочтительно перекрывают одну из SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11 на по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или все 19 нуклеотидов (на любом конце одной из SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11).

Соответственно, согласно настоящему изобретению предложена нуклеиновая кислота, способная, при введении или экспрессии подходящим образом в клетке млекопитающего, которая в ином случае экспрессирует IL-11 или IL-11R α , подавлять экспрессию IL-11 или IL-11R α путем РНКи, причем указанная нуклеиновая кислота в основном нацелена на последовательность одной из SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11.

«В основном нацеленная» нуклеиновая кислота может быть нацелена на последовательность, которая перекрывается с SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11. В частности, нуклеиновая кислота может быть нацелена на последовательность в иРНК IL-11 или IL-11R α человека, которая незначительно длиннее или короче, чем одна из SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11 (предпочтительно от 17-23 нуклеотидов в длину), но в остальном идентична одной из SEQ ID NO с 4 по 7 или с 8 по 11.

Ожидается, что абсолютная идентичность/комплементарность между нуклеиновой кислотой согласно настоящему изобретению и последовательностью-мишенью не является существенной, однако является предпочтительной. Соответственно, нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может содержать одно несоответствие по сравнению с иРНК IL-11 или IL-11R α . Однако ожидается, что наличие даже одного

несоответствия, вероятно, приведет к снижению эффективности, поэтому отсутствие несоответствий является предпочтительным. Если присутствуют 3'-липкие концы, они могут быть исключены из рассмотрения количества несоответствий.

Согласно одному варианту реализации нуклеиновая кислота (называемая в настоящей заявке двухцепочечной миРНК) содержит последовательности двухцепочечной РНК, показанные в SEQ ID NO с 12 по 15. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота (называемая в настоящей заявке двухцепочечной миРНК) содержит последовательности двухцепочечной РНК, представленные в SEQ ID NO с 16 по 19.

Однако также ожидается, что незначительно более короткие или более длинные последовательности, направленные к одной и той же области иРНК IL-11 или IL-11R α , также будут эффективными. В частности, ожидается, что двухцепочечные последовательности от 17 до 23 п.о. в длину также будут эффективными.

Согласно настоящему изобретению также предложена ДНК, которая при транскрибировании в клетке млекопитающего дает РНК (также называемую в настоящей заявке кшРНК), имеющую две комплементарные части, которые способны к самогибридизации с получением двухцепочечного мотива, например, включая последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: с 12 по 15 или с 16 по 19, или последовательность, которая отличается от любой из вышеупомянутых последовательностей заменой одной пары оснований.

Комплементарные части могут быть соединены спейсером, который имеет подходящую длину и последовательность, чтобы обеспечить гибридизацию двух комплементарных частей друг с другом. Предпочтительно 5'-конец спейсера (расположенный непосредственно в 3'-направлении относительно предшествующей комплементарной части) состоит из нуклеотидов -UU- или -UG-, как упоминалось выше, предпочтительно -UU- (однако, как упоминалось выше, применение этих конкретных динуклеотидов не является существенным). Подходящий спейсер, рекомендованный для применения в системе pSuper от OligoEngine (Сиэтл, Вашингтон, США), представляет собой UUCAAGAGA. В этом и других случаях концы спейсера могут гибридизоваться друг с другом, например, удлиняя двухцепочечный мотив за пределы точных последовательностей SEQ ID NO с 12 по 15 или с 16 по 19 на небольшое число (например, 1 или 2) пар оснований.

Двухцепочечные миРНК согласно настоящему изобретению могут быть введены в клетки млекопитающих *in vitro* или *in vivo* с использованием известных методик, описанных ниже, для подавления экспрессии IL-11 или рецептора IL-11.

Аналогичным образом, векторы транскрипции, содержащие ДНК согласно настоящему изобретению, могут быть введены в опухолевые клетки *in vitro* или *in vivo* с использованием известных методик, описанных ниже, для кратковременной или стабильной экспрессии РНК, как упоминалось выше, для подавления экспрессии IL-11 или рецептора IL-11.

Соответственно, согласно настоящему изобретению также предложен способ подавления экспрессии IL-11 или рецептора IL-11 в клетке млекопитающего, например, человека, причем указанный способ включает введение в клетку двухцепочечной миРНК согласно настоящему изобретению или вектора транскрипции согласно настоящему изобретению.

Аналогичным образом, согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечен ангиогенез, причем указанный способ включает введение субъекту двухцепочечной миРНК согласно настоящему изобретению или вектора транскрипции согласно настоящему изобретению в комбинации с антагонистом передачи сигнала IL-11.

Согласно настоящему изобретению также предложены двухцепочечные миРНК согласно настоящему изобретению и векторы транскрипции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения в комбинации с антагонистом передачи сигнала IL-11.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение двухцепочечных миРНК согласно настоящему изобретению и векторов транскрипции согласно настоящему изобретению в изготовлении лекарственного средства для лечения заболевания/состояния в комбинации с антагонистом передачи сигнала IL-11.

Ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать действие IL-11, могут обладать одним или более из следующих функциональных свойств:

- Ингибирование опосредуемой IL-11 передачи сигнала;
- Ингибирование передачи сигнала, опосредуемой связыванием IL-11 с рецепторным комплексом IL-11R α :gp130;
- Ингибирование передачи сигнала, опосредуемой связыванием комплекса IL-11:IL-11R α с gp130 (т. е. *транс*-передачи сигнала IL-11);
- Ингибирование процесса, опосредуемого IL-11;
- Ингибирование образования миофибробластов;
- Ингибирование пролиферации/миграции SMC;

- Ингибирование экспрессии гена/белка коллагена или IL-11.

Эти свойства могут быть определены с помощью исследования соответствующего агента в подходящем анализе, который может включать сравнение эффективности агента с подходящими контрольными агентами. Квалифицированный специалист может
5 определить соответствующие контрольные условия для конкретного анализа.

Опосредуемая IL-11 передача сигнала и/или процессы, опосредуемые IL-11, включают передачу сигнала, опосредуемую фрагментами IL-11 и полипептидными комплексами, содержащими IL-11 или его фрагменты. Опосредуемая IL-11 передача сигнала может представлять собой передачу сигнала, опосредуемую IL-11 человека и/или
10 IL-11 мыши. Передача сигнала, опосредуемая IL-11, может происходить после связывания IL-11 или IL-11-содержащего комплекса с рецептором, с которым связывается IL-11 или указанный комплекс.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать биологическую активность IL-11 или IL-11-содержащего
15 комплекса.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой антагонист одного или более сигнальных путей, которые активируются передачей сигнала посредством рецепторов, содержащих IL-11R α и/или gp130, например, IL-11R α :gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего
20 изобретения агент способен ингибировать передачу сигнала посредством одного или более иммунных рецепторных комплексов, содержащих IL-11R α и/или gp130, например, IL-11R α :gp130. Согласно различным аспектам настоящего изобретения агент, предложенный в настоящей заявке, способен ингибировать опосредуемую IL-11 *цис*-и/или *транс*-передачу сигнала.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать опосредуемую IL-11 передачу сигнала до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее,
25 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня передачи сигнала в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен уменьшать опосредуемую IL-11 передачу сигнала менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$
30 раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза,

$\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня передачи сигнала в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения опосредуемая IL-11 передача сигнала может быть опосредована связыванием IL-11 с рецептором IL-11R α :gp130. Такая передача сигнала может быть исследована, например, путем обработки клеток, экспрессирующих IL-11R α и gp130, с применением IL-11, или путем стимуляции выработки IL-11 в клетках, которые экспрессируют IL-11R α и gp130.

ИК₅₀ агента в отношении ингибирования опосредуемой IL-11 передачи сигнала может быть определена, например, путем культивирования клеток Ba/F3, экспрессирующих IL-11R α и gp130, в присутствии IL-11 человека и агента, и измерения включения ³H-тимидина в ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может проявлять ИК₅₀ 10 мкг/мл или менее, предпочтительно одно из ≤ 5 мкг/мл, ≤ 4 мкг/мл, $\leq 3,5$ мкг/мл, ≤ 3 мкг/мл, ≤ 2 мкг/мл, ≤ 1 мкг/мл, $\leq 0,9$ мкг/мл, $\leq 0,8$ мкг/мл, $\leq 0,7$ мкг/мл, $\leq 0,6$ мкг/мл или $\leq 0,5$ мкг/мл в таком анализе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения опосредуемая IL-11 передача сигнала может быть опосредована связыванием комплекса IL-11:IL-11R α с gp130. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комплекс IL-11:IL-11R α может быть растворимым, например, комплекс внеклеточного домена IL-11R α и IL-11 или комплекс растворимой изоформы/фрагмента IL-11R α и IL-11. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения растворимый IL-11R α представляет собой растворимую (секретируемую) изоформу IL-11R α или представляет собой высвобожденный продукт протеолитического отщепления внеклеточного домена IL-11R α , связанного с клеточной мембраной.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комплекс IL-11:IL-11R α может быть связан с клеткой, например, комплекс связанного с клеточной мембраной IL-11R α и IL-11. Передача сигнала, опосредуемая связыванием комплекса IL-11:IL-11R α с gp130, может быть исследована путем обработки клеток, экспрессирующих gp130, комплексом IL-11:IL-11R α , например, рекомбинантным гибридным белком, содержащим IL-11, соединенный пептидным линкером с внеклеточным доменом IL-11R α (например, гипер IL-11, как описано в настоящей заявке).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать передачу сигнала, опосредуемую связыванием комплекса IL-11:IL-11R α с gp130, а также способен ингибировать передачу сигнала, опосредуемую связыванием IL-11 с рецептором IL-11R α :gp130.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать процесс, опосредуемый IL-11, например, после стимуляции с применением TGFβ1. Процессы, опосредуемые IL-11, включают, например, образование миофибробластов из фибробластов, пролиферацию/миграцию SMC и экспрессию гена/белка, например, коллагена и IL-11, и могут быть оценены как *in vitro*, так и *in vivo*.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать образование миофибробластов из фибробластов, например, после воздействия профиброзного фактора (например, TGFβ1) на фибробласты. Образование миофибробластов из фибробластов можно изучить с помощью исследования маркеров миофибробластов.

Фибробласты могут происходить из любой ткани, включая печень, легкие, почку, сердце, кровеносные сосуды, глаз, кожу, поджелудочную железу, селезенку, кишечник (например, толстый или тонкий кишечник), головной мозг и костный мозг. Согласно конкретным вариантам реализации настоящего изобретения фибробласты могут представлять собой фибробласты сердца (например, фибробласты предсердий), фибробласты кожи, фибробласты легких, фибробласты почек или фибробласты печени. Фибробласты могут характеризоваться экспрессией гена или белка одного или более из COL1A, ACTA2, пролил-4-гидроксилазы, MAS516 и FSP1. Маркеры миофибробластов могут включать один или более из повышенного αSMA, виментина, палладина, кофилина или десмина (по сравнению с уровнем экспрессии сопоставимыми фибробластами (например, фибробластами, происходящими из той же ткани)).

Образование миофибробластов из фибробластов может быть исследовано путем измерения уровней экспрессии белка αSMA с использованием системы визуализации Operetta High-Content после стимуляции фибробластов с применением TGFβ1; см., например, WO 2017/103108 A1, который тем самым полностью включен посредством ссылки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать образование миофибробластов из фибробластов до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня образования миофибробластов из фибробластов в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен уменьшать образование

миофибробластов из фибробластов менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня образования миофибробластов из фибробластов в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать пролиферацию SMC (например, секреторных SMC), например, после стимуляции с применением TGF β 1. Пролиферация SMC может быть измерена с использованием, например, анализов включения ^3H -тимидина, разведения CFSE или включения EdU, как описано в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать пролиферацию SMC до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня пролиферации в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен подавлять пролиферацию SMC менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня пролиферации в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать миграцию SMC (например, секреторных SMC), например, после стимуляции с применением TGF β 1. Миграция SMC может быть измерена с помощью анализа зарастания царапины, например, как описано в примере 9 и в Liang et al., Nat Protoc. (2007) 2(2):329-33, или с использованием анализа в камере Бойдена, как описано в примере 9 и в Chen, Methods Mol Biol. (2005) 294:15-22.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать миграцию SMC до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня

миграции в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен ингибировать миграцию SMC менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня миграции в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать экспрессию гена/белка коллагена или IL-11. Экспрессия гена и/или белка может быть измерена, как описано в настоящей заявке.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать экспрессию гена/белка коллагена или IL-11 до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня экспрессии в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен ингибировать экспрессию гена/белка коллагена или IL-11 менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня экспрессии в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента).

Антагонисты ангиогенных факторов

Аспекты настоящего изобретения включают антагонистическое действие (т. е. ингибирование) на ангиогенез, например, антагонистическое действие на один или более ангиогенных факторов.

В настоящей заявке «ингибирование» относится к уменьшению, снижению или убавлению по сравнению с контрольным условием. Например, ингибирование действия ангиогенного фактора антагонистом ангиогенной передачи сигнала относится к уменьшению, снижению или убавлению интенсивности/степени ангиогенной передачи сигнала в отсутствие агента и/или в присутствии соответствующего контрольного агента.

В настоящей заявке ингибирование также может называться нейтрализацией или антагонистическим действием. Об антагонисте ангиогенной передачи сигнала (например, антагонисте активности, опосредуемой ангиогенным фактором) можно сказать, что он

является «нейтрализующим» или «антагонистическим» агентом в отношении соответствующей функции или процесса. Например, агент, который способен ингибировать ангиогенную передачу сигнала, может называться агентом, который способен нейтрализовать ангиогенную передачу сигнала, или может называться антагонистом ангиогенной передачи сигнала.

Ангиогенные пути передачи сигнала обеспечивают множество путей ингибирования передачи сигнала. Антагонист ангиогенной передачи сигнала может ингибировать действие ангиогенного фактора посредством ингибирования действия одного или более факторов, участвующих или необходимых для передачи сигнала посредством рецептора для этого фактора.

Например, ингибирование может быть достигнуто путем нарушения взаимодействия между ангиогенным фактором (например, VEGF) и рецептором для этого фактора (например, VEGFR1, 2 или 3). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибирование ангиогенной передачи сигнала достигается путем ингибирования экспрессии гена или белка одного или более, например, из VEGF, VEGFR1, VEGFR2 и VEGFR3.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонистическое действие (т. е. ингибирование) на ангиогенез приводит к антагонистическому действию на фиброз, его ингибированию или уменьшению.

Связывающие агенты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать передачу сигнала, опосредуемую ангиогенным фактором, могут связываться с ангиогенным фактором. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать передачу сигнала, опосредуемую ангиогенным фактором, могут связываться с рецептором для ангиогенного фактора (например, VEGFR1, VEGFR2 или VEGFR3 для VEGF). Связывание таких агентов может ингибировать передачу сигнала, опосредуемую ангиогенным фактором, уменьшая/предотвращая способность лиганда ангиогенного фактора связываться с рецепторами, что ингибирует последующую передачу сигнала.

Агенты, способные связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, могут быть любого типа, но согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может представлять собой антитело, его антигенсвязывающий фрагмент, полипептид, пептид, нуклеиновую кислоту, олигонуклеотид, аптамер или малую молекулу. Агенты могут быть обеспечены в

выделенной или очищенной форме или могут быть изготовлены в виде фармацевтической композиции или лекарственного средства.

Свойства агентов, связывающих ангиогенный фактор

Агенты, способные связываться с ангиогенным фактором/комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для конкретного ангиогенного фактора в соответствии с настоящим изобретением, могут проявлять одно или более из следующих свойств:

- Специфичное связывание с ангиогенным фактором/комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора;
- Связывание с ангиогенным фактором/комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора с K_D 10 мкМ или менее, предпочтительно одно из ≤ 5 мкМ, ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ или ≤ 100 пМ;
- Ингибирование взаимодействия между ангиогенным фактором и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора;

Эти свойства могут быть определены с помощью исследования соответствующего агента в подходящем анализе, который может включать сравнение эффективности агента с подходящими контрольными агентами. Квалифицированный специалист может определить соответствующие контрольные условия для конкретного анализа. Как объясняется в настоящей заявке, партнер по взаимодействию для ангиогенного фактора может представлять собой, например, лиганд для ангиогенного фактора (например, если ангиогенный фактор является рецептором, например, рецептором VEGF, рецептором FGF или рецептором PDGF), или может представлять собой рецептор для ангиогенного фактора (например, если ангиогенный фактор представляет собой лиганд, например, VEGF, FGF или PDGF).

Например, подходящий отрицательный контроль для исследования способности тестируемого антитела/антигенсвязывающего фрагмента связываться с ангиогенным фактором/комплексом, содержащим ангиогенный фактор/партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, может представлять собой антитело/антигенсвязывающий фрагмент, направленный против нецелевого белка (т. е. которое (ый) не является специфичным в отношении ангиогенного фактора/комплекса, содержащего ангиогенный фактор/партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора). Подходящий положительный контроль может представлять собой известное подтвержденное (например, доступное коммерчески) антитело, связывающее ангиогенный фактор или партнера по взаимодействию. Контроли могут быть того же изотипа, что и предполагаемое антитело/антигенсвязывающий фрагмент, связывающие ангиогенный

фактор/комплекс, содержащий ангиогенный фактор/партнера по взаимодействию, и могут иметь, например, такие же константные области.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен специфично связываться с ангиогенным фактором или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора. Агент, который специфично связывается с конкретной молекулой-мишенью, предпочтительно связывает мишень с большей аффинностью и/или с большей продолжительностью, чем он связывается с другими нецелевыми молекулами.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения степень связывания связывающего агента с нецелевой молекулой составляет менее чем примерно 10% от связывания агента с мишенью, согласно результатам измерения, например, с помощью ИФА, SPR, интерферометрии биослоя (BLI), маломасштабного термофореза (MST) или с помощью радиоиммуноанализа (РИА). В качестве альтернативы, специфичность связывания может быть представлена как аффинность связывания, когда связывающий агент связывается с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора с K_D , которая на по меньшей мере 0,1 порядка величины (т. е. $0,1 \times 10^n$, где n это целое число, представляющее порядок величины) больше K_D в отношении другой нецелевой молекулы. Это необязательно может быть одно из по меньшей мере 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5 или 2,0.

Аффинность связывания конкретного связывающего агента в отношении его мишени часто описывают как его константу диссоциации (K_D). Аффинность связывания может быть измерена с помощью способов, известных в данной области техники, таких как ИФА, поверхностный плазмонный резонанс (SPR; см., например, Hearty et al., *Methods Mol Biol* (2012) 907:411-442; или Rich et al., *Anal Biochem.* 2008 Feb 1; 373(1):112-20), интерферометрия биослоя (см., например, Lad et al., (2015) *J Biomol Screen* 20(4): 498-507; или Concepcion et al., *Comb Chem High Throughput Screen.* 2009 Sep; 12(8):791-800), исследование методом маломасштабного термофореза (MST) (см., например, Jerabek-Willemsen et al., *Assay Drug Dev Technol.* 2011 Aug; 9(4): 342–353) или анализ связывания антигена с радиоактивной меткой (РИА).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен связываться с ангиогенным фактором или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора с K_D 50 мкМ или менее, предпочтительно одно из ≤ 10 мкМ, ≤ 5 мкМ, ≤ 4 мкМ, ≤ 3 мкМ, ≤ 2 мкМ, ≤ 1 мкМ, ≤ 500 нМ, ≤ 100 нМ, ≤ 75 нМ, ≤ 50 нМ, ≤ 40 нМ, ≤ 30 нМ, ≤ 20 нМ, ≤ 15 нМ, $\leq 12,5$ нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 9 нМ,

≤ 8 нМ, ≤ 7 нМ, ≤ 6 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ, ≤ 1 нМ, ≤ 500 пМ, ≤ 400 пМ, ≤ 300 пМ, ≤ 200 пМ или ≤ 100 пМ.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент связывается с ангиогенным фактором, комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора с аффинностью связывания (например, определенной с помощью ИФА) $ЭК_{50}=10000$ нг/мл или менее, предпочтительно одно из ≤ 5000 нг/мл, ≤ 1000 нг/мл, ≤ 900 нг/мл, ≤ 800 нг/мл, ≤ 700 нг/мл, ≤ 600 нг/мл, ≤ 500 нг/мл, ≤ 400 нг/мл, ≤ 300 нг/мл, ≤ 200 нг/мл, ≤ 100 нг/мл, ≤ 90 нг/мл, ≤ 80 нг/мл, ≤ 70 нг/мл, ≤ 60 нг/мл, ≤ 50 нг/мл, ≤ 40 нг/мл, ≤ 30 нг/мл, ≤ 20 нг/мл, ≤ 15 нг/мл, ≤ 10 нг/мл, $\leq 7,5$ нг/мл, ≤ 5 нг/мл, $\leq 2,5$ нг/мл или ≤ 1 нг/мл. Такие ИФА могут быть выполнены, например, как описано в Antibody Engineering, vol. 1 (2 изд.), Springer Protocols, Springer (2010), Part V, pp657-665.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент связывается с ангиогенным фактором или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, в области, которая важна для связывания с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, и посредством этого ингибирует взаимодействие между ангиогенным фактором или комплексом, содержащим комплекс ангиогенного фактора, и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора (например, передача сигнала посредством рецептора ангиогенного фактора). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент связывается с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора в области, которая важна для связывания с ангиогенным фактором или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, и посредством этого ингибирует взаимодействие между ангиогенным фактором или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора (например, передача сигнала посредством рецептора ангиогенного фактора).

Способность конкретного связывающего агента (например, агента, способного связывать ангиогенный фактор/комплекс, содержащий ангиогенный фактор, или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора) ингибировать взаимодействие между двумя белками может быть определена, например, путем исследования взаимодействия в присутствии связывающего агента, или после инкубации одного или обоих партнеров по взаимодействию с ним. Примером подходящего анализа для определения способности конкретного связывающего агента ингибировать взаимодействие между двумя партнерами по взаимодействию является конкурентный ИФА.

Связывающий агент, который способен ингибировать конкретное взаимодействие (например, между ангиогенным фактором и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, например, между VEGF и одним или более из VEGFR1-3), идентифицируют на основании наблюдения уменьшения/снижения уровня взаимодействия между партнерами по взаимодействию в присутствии связывающего агента, или после инкубации одного или обоих партнеров по взаимодействию с ним, по сравнению с уровнем взаимодействия в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Подходящее исследование может быть выполнено *in vitro*, например, с использованием рекомбинантных партнеров по взаимодействию или с использованием клеток, экспрессирующих партнеров по взаимодействию. Клетки могут экспрессировать партнеров по взаимодействию эндогенно или с нуклеиновой кислоты, введенной в клетку. Для целей таких анализов один или оба партнера по взаимодействию и/или связывающий агент могут быть помечены или могут использоваться вместе с обнаруживаемой частицей для целей обнаружения и/или измерения уровня взаимодействия. Например, агент может быть помечен радиоактивным атомом или окрашенной молекулой, или флуоресцентной молекулой, или молекулой, которую можно легко обнаружить любым другим путем. Подходящие обнаруживаемые молекулы включают флуоресцентные белки, люциферазу, субстраты ферментов и радиоактивные метки. Связывающий агент может быть непосредственно помечен обнаруживаемой меткой или может быть помечен опосредовано. Например, связывающий агент может не содержать метку и может быть обнаружен с помощью другого связывающего агента, который сам помечен. В качестве альтернативы, второй связывающий агент может содержать связанный с ним биотин, и связывание меченого стрептавидина с биотином можно использовать для опосредованного мечения первого связывающего агента.

Способность связывающего агента ингибировать взаимодействие между двумя партнерами по связыванию также может быть определена путем исследования последующих функциональных последствий такого взаимодействия, например, передачи сигнала, опосредуемой ангиогенным фактором.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между ангиогенным фактором и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее,

20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня взаимодействия между ангиогенным фактором и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может быть способен ингибировать взаимодействие между ангиогенным фактором и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня взаимодействия между ангиогенным фактором и партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора в отсутствие связывающего агента (или в присутствии соответствующего контрольного связывающего агента).

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, представляет собой полипептид, например, молекулу рецептора-ловушки. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, может представлять собой аптамер.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Примерные антитела, способные связываться с ангиогенными факторами, включают антитела, способные связывать VEGF, например, бевацизумаб и ранибизумаб.

Антитела/фрагменты могут представлять собой антагонистические антитела/фрагменты, которые ингибируют или уменьшают биологическую активность ангиогенного фактора. Антитела/фрагменты могут представлять собой нейтрализующие антитела, которые нейтрализуют биологический эффект ангиогенного фактора, например, его способность стимулировать эффективную передачу сигнала за счет рецептора ангиогенного фактора.

Рецепторы-ловушки

Агенты, на основе пептида или полипептида, способные связываться с ангиогенным фактором или комплексом, содержащим ангиогенный фактор, могут быть основаны на рецепторе ангиогенного фактора, например, фрагменте, связывающем ангиогенный фактор, рецептора ангиогенного фактора.

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может содержать фрагмент, связывающий ангиогенный фактор, внеклеточного домена рецептора и предпочтительно может быть растворимым и/или может не содержать один или более, или все, из трансмембранных доменов. Такие молекулы могут быть описаны как рецепторы-ловушки.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может содержать рекомбинантный гибридный белок второго иммуноглобулинового (Ig) домена VEGFR-1 и третьего Ig-домена VEGFR-2, гибридизованных с константной областью (Fc) человека IgG1. Примером рецептора-ловушки ангиогенеза является афлиберцепт (Эйлеа (Eylea), SEQ ID NO:24).

15 Таким образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент может представлять собой рецептор-ловушку, например, растворимый рецептор для ангиогенного фактора и/или комплексов, содержащих ангиогенный фактор.

Рецепторы-ловушки ангиогенного фактора предпочтительно связываются с
20 ангиогенным фактором и/или комплексами, содержащими ангиогенный фактор, что приводит к недоступности этих молекул для связывания с их рецепторами. Таким образом, они действуют как рецепторы-«ловушки», и ангиогенная передача сигнала уменьшается по сравнению с уровнем передачи сигнала в отсутствие рецептора-ловушки.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор-
25 ловушка может быть способен связывать ангиогенный фактор, например, с аффинностью связывания по меньшей мере 100 мкМ или менее, необязательно одно из 10 мкМ или менее, 1 мкМ или менее, 100 нМ или менее или примерно от 1 до 100 нМ. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения рецептор-ловушка может содержать весь или часть домена, связывающего ангиогенный фактор, и необязательно
30 может не содержать все или часть из трансмембранных доменов. Рецептор-ловушка необязательно может быть гибридизован с константной областью иммуноглобулина, например, областью Fc IgG.

Ингибиторы

Согласно настоящему изобретению предусмотрено применение ингибирующих
35 молекул, способных связываться с одним или более из ангиогенного фактора, комплекса,

содержащего ангиогенный фактор, или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, и ингибировать ангиогенную передачу сигнала.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой связывающий агент на основе пептида или полипептида, основанный на ангиогенном факторе, например, мутант, вариант или связывающий фрагмент ангиогенного фактора. Подходящие агенты на основе пептида или полипептида могут связываться с рецептором для ангиогенного фактора (например, VEGFR1, 2 и/или 3) таким образом, который не приводит к инициации передачи сигнала или который вызывает субоптимальную передачу сигнала. Мутанты этого типа могут действовать как конкурентные ингибиторы эндогенных ангиогенных факторов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения связывающий агент, способный к антагонистическому действию на ангиогенный фактор, может быть в виде низкомолекулярного ингибитора.

Низкомолекулярные ингибиторы ангиогенеза могут представлять собой ингибиторы тирозинкиназ. Было разработано множество низкомолекулярных ингибиторов тирозинкиназ. Учитывая функциональную избыточность компонентов ангиогенного пути, эти лекарственные средства нацелены на множество киназ, таких как VEGFR. Они включают пазопаниб (вотриент[®]), ингибитор VEGF, рецептора тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) и KIT; сорафениб (нексавар[®]), ингибитор VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β и RAF1; сунитиниб (сутент[®]), ингибитор VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β и RET; вандетаниб (капрелса[®]), ингибитор VEGFR и рецептора эпидермального фактора роста; кабозантиниб (кометрик[®]), ингибитор MET и VEGFR2; акситиниб (инлита[®]), ингибитор VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3; ваталаниб, ингибитор известных рецепторов VEGF, а также бета-рецептора тромбоцитарного фактора роста и c-kit, но наиболее селективный в отношении VEGFR-2; и регорафениб (стиварга[®]), ингибитор VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, TIE2, PDGFR, рецептора фактора роста фибробластов, KIT, RET и RAFf.

Другие низкомолекулярные ингибиторы ангиогенеза включают ацетат анекортава и лактат скваламина.

30 *Аптамеры*

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный связываться с ангиогенным фактором/комплексом, содержащим ангиогенный фактор, или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора, представляет собой аптамер.

Примерным аптамерным ингибитором ангиогенного фактора является аптамер против VEGF, пептапаниб, который описан в WO9818480 A1, полностью включенном в настоящую заявку посредством ссылки.

Агенты, способные уменьшать экспрессию ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора

Согласно аспектам настоящего изобретения может быть обеспечен антагонист передачи сигнала, опосредуемой ангиогенным фактором, который способен предотвращать или уменьшать экспрессию одного или более из ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

Экспрессия может представлять собой экспрессию гена или белка и может быть определена, как описано в настоящей заявке. Экспрессия может осуществляться клеткой/тканью/органом/системой органов субъекта.

Подходящие агенты могут быть любого типа, но согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный предотвращать или уменьшать экспрессию одного или более из ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, может представлять собой малую молекулу или олигонуклеотид.

Агент, способный предотвращать или уменьшать экспрессию одного или более из ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, может осуществлять это, например, посредством ингибирования транскрипции гена, кодирующего ангиогенный фактор или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, ингибирования посттранскрипционного процессинга РНК, кодирующей ангиогенный фактор или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, уменьшения стабильности РНК, кодирующей ангиогенный фактор или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, стимулирования разрушения РНК, кодирующей ангиогенный фактор или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, ингибирования посттрансляционного процессинга ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, уменьшения стабильности ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, или стимулирования разрушения ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

Согласно настоящему изобретению предусмотрено применение антисмысловой нуклеиновой кислоты для предотвращения/уменьшения экспрессии ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент, способный предотвращать или

уменьшать экспрессию ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, может вызывать уменьшение экспрессии путем РНК-интерференции (РНКи).

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может представлять собой ингибирующую нуклеиновую кислоту, такую как антисмысловая или малая интерферирующая РНК, включая, но не ограничиваясь ими, кшРНК, дцРНК, мкРНК или миРНК.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ингибирующая нуклеиновая кислота обеспечена в векторе. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может представлять собой лентивирусный вектор, кодирующий кшРНК для одного или более из ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

15 Принимая во внимание известные последовательности нуклеиновых кислот для ангиогенных факторов и их партнеров по взаимодействию (например, известные последовательности иРНК, доступные в GenBank под номерами доступа: AY047581.1 GI: 15422108 (VEGF-A человека), AF317892.1 GI: 12802453 (VEGF мыши), AY033508.1 GI: 15822724 (VEGF крысы), NM_002253.3 GI: 1333881084 (рецептор VEGF человека), NM_025809.5 GI: 237512936 (рецептор VEGF мыши), NM_019306.2 GI: 828178218 (рецептор VEGF крысы), олигонуклеотиды могут быть сконструированы для подавления
20 или подавления экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора.

Такие олигонуклеотиды могут иметь любую длину, но предпочтительно могут быть короткими, например, менее 100 нуклеотидов, например, 10-40 нуклеотидов или 20-50 нуклеотидов, и могут содержать нуклеотидную последовательность, имеющую полную или почти полную комплементарность (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,
25 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% комплементарность) с последовательностью нуклеотидов соответствующей длины в целевом олигонуклеотиде, например, иРНК ангиогенного фактора или иРНК партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора. Комплементарная область нуклеотидной последовательности может иметь любую длину, но предпочтительно составляет по меньшей мере 5, и необязательно не более 50
30 нуклеотидов в длину, например, одно из 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 нуклеотидов.

Подавление экспрессии ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора предпочтительно приведет к снижению количества ангиогенного
35 фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, экспрессированного

клеткой/тканью/органом/системой органов/субъектом. Например, в конкретной клетке подавление ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора путем введения подходящей нуклеиновой кислоты приведет к снижению количества ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, экспрессированного этой клеткой, по сравнению с необработанной клеткой. Подавление может быть частичным. Предпочтительная степень подавления составляет по меньшей мере 50%, более предпочтительно одно из по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85% или 90%. Уровень подавления от 90% до 100% считается «подавлением» экспрессии или функции.

Другой альтернативой является экспрессия молекулы короткой шпилечной РНК (кшРНК) в клетке. Предпочтительно молекула кшРНК содержит неполную последовательность ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора. Предпочтительно последовательность кшРНК составляет от 40 до 100 оснований в длину, более предпочтительно от 40 до 70 оснований в длину. Стержень шпильки предпочтительно составляет от 19 до 30 пар оснований в длину. Стержень может содержать пары G-U для стабилизации структуры шпильки.

Молекулы миРНК, более длинные молекулы дцРНК или молекулы мкРНК могут быть получены рекомбинантно путем транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты, предпочтительно содержащейся в векторе. Предпочтительно молекула миРНК, более длинная молекула дцРНК или молекула мкРНК содержит неполную последовательность ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

Согласно одному варианту реализации миРНК, более длинную дцРНК или мкРНК получают эндогенно (внутри клетки) путем транскрипции с вектора. Подходящие векторы могут представлять собой олигонуклеотидные векторы, сконфигурированные для экспрессии олигонуклеотидного агента, способного к подавлению ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора. Такие векторы могут представлять собой вирусные векторы или плазмидные векторы.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предложена нуклеиновая кислота, которая способна, при введении или экспрессии подходящим образом в клетке млекопитающего, например, человека, которая в ином случае экспрессирует ангиогенный фактор или рецептор ангиогенного фактора, подавлять экспрессию ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора путем РНКи.

Принимая во внимание известные последовательности нуклеиновых кислот для ангиогенных факторов и их партнеров по взаимодействию (например, известные последовательности иРНК, доступные в GenBank под номерами доступа: AF437895.1 GI: 16660685 (VEGF человека), U41383.1 GI: 1134964 (VEGF мыши), NM_001287107.1 GI: 560186576 (VEGF крысы), NM_002253.3 GI: 1333881084 (рецептор VEGF человека), NM_001001183.1 GI: 47564089 (рецептор VEGF мыши), NM_019306.2 GI: 828178218 (рецептор VEGF крысы), олигонуклеотиды могут быть сконструированы для ингибирования или подавления экспрессии ангиогенного фактора или рецептора ангиогенного фактора.

Нуклеиновая кислота может иметь существенную идентичность последовательности с частью иРНК ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, например, как определено в GenBank под номером доступа M32977.1 GI: 181970 (VEGF), BC131822.1 GI: 124297527 (рецептор VEGF), или с последовательностью, комплементарной указанной иРНК.

Нуклеиновая кислота может представлять собой двухцепочечную миРНК. (Как будет понятно специалисту и как подробно объяснено ниже, молекула миРНК может также содержать короткую 3'-последовательность ДНК.)

В качестве альтернативы, нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК (обычно двухцепочечную ДНК), которая при транскрибировании в клетке млекопитающего дает РНК, имеющую две комплементарные части, соединенные за счет спейсера так, что РНК принимает форму шпильки при гибридизации комплементарных частей друг с другом. В клетке млекопитающего структура шпильки может быть отщеплена от молекулы ферментом DICER с получением двух отдельных, но гибридизованных молекул РНК.

Согласно настоящему изобретению также предложена ДНК, которая при транскрибировании в клетке млекопитающего дает РНК (также называемую в настоящей заявке кшРНК), имеющую две комплементарные части, которые способны к самогибридизации с получением двухцепочечного мотива, например, включая последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: с 14 по 17 или с 18 по 21, или последовательность, которая отличается от любой из вышеупомянутых последовательностей заменой одной пары оснований.

Комплементарные части обычно будут соединены спейсером, который имеет подходящую длину и последовательность, чтобы обеспечить гибридизацию двух комплементарных частей друг с другом. Предпочтительно 5'-конец спейсера (расположенный непосредственно в 3'-направлении относительно предшествующей

комплементарной части) состоит из нуклеотидов -UU- или -UG-, как упоминалось выше, предпочтительно -UU- (однако, как упоминалось выше, применение этих конкретных динуклеотидов не является существенным). Подходящий спейсер, рекомендованный для применения в системе pSuper от OligoEngine (Сиэтл, Вашингтон, США), представляет собой UUCAAGAGA. В этом и других случаях концы спейсера могут гибридизоваться друг с другом, например, удлиняя двухцепочечный мотив за пределы точных последовательностей SEQ ID NO с 14 по 17 или с 18 по 21 на небольшое число (например, 1 или 2) пар оснований.

Двухцепочечные миРНК согласно настоящему изобретению могут быть введены в клетки млекопитающих *in vitro* или *in vivo* с использованием известных методик, описанных ниже, для подавления экспрессии ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

Аналогичным образом, векторы транскрипции, содержащие ДНК согласно настоящему изобретению, могут быть введены в опухолевые клетки *in vitro* или *in vivo* с использованием известных методик, описанных ниже, для кратковременной или стабильной экспрессии РНК, как упоминалось выше, для подавления экспрессии ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

Соответственно, согласно настоящему изобретению также предложен способ подавления экспрессии ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора в клетке млекопитающего, например, человека, причем указанный способ включает введение в клетку двухцепочечной миРНК согласно настоящему изобретению или вектора транскрипции согласно настоящему изобретению.

Аналогичным образом, согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечен фиброз и/или ангиогенез, причем указанный способ включает введение субъекту двухцепочечной миРНК согласно настоящему изобретению или вектора транскрипции согласно настоящему изобретению в комбинации с антагонистом ангиогенного фактора.

Согласно настоящему изобретению также предложены двухцепочечные миРНК согласно настоящему изобретению и векторы транскрипции согласно настоящему изобретению для применения в способе лечения в комбинации с антагонистом ангиогенного фактора, предпочтительно в способе лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечен фиброз и/или ангиогенез.

Согласно настоящему изобретению также предложено применение двухцепочечных миРНК согласно настоящему изобретению и векторов транскрипции согласно настоящему изобретению в комбинации с антагонистом ангиогенного фактора в

получении лекарственного средства для лечения заболевания/состояния, при котором патологически вовлечен фиброз и/или ангиогенез.

Ингибирование передачи сигнала, опосредуемой ангиогенным фактором

Согласно вариантам реализации настоящего изобретения агенты, способные ингибировать действие (т. е. оказывать антагонистическое действие) ангиогенного фактора, могут обладать одним или более из следующих функциональных свойств:

- Ингибирование передачи сигнала, опосредуемой ангиогенным фактором;
- Ингибирование передачи сигнала, опосредуемой связыванием ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора;
- Ингибирование процесса, опосредуемого ангиогенным фактором;
- Ингибирование вставания;
- Ингибирование разрастания капилляров;
- Ингибирование отека.

Эти свойства могут быть определены с помощью исследования соответствующего агента в подходящем анализе, который может включать сравнение эффективности агента с подходящими контрольными агентами. Квалифицированный специалист может определить соответствующие контрольные условия для конкретного анализа.

Передача сигнала, опосредуемая ангиогенным фактором, и/или процессы, опосредуемые ангиогенным фактором, включают передачу сигнала, опосредуемую фрагментами ангиогенного фактора и полипептидными комплексами, содержащими ангиогенный фактор или его фрагменты. Передача сигнала, опосредуемая ангиогенным фактором, может представлять собой передачу сигнала, опосредуемую ангиогенным фактором человека и/или ангиогенным фактором мыши. Передача сигнала, опосредуемая ангиогенным фактором, может происходить после связывания ангиогенного фактора или комплекса, содержащего ангиогенный фактор, с партнером по взаимодействию (например, рецептором или лигандом), с которым связывается ангиогенный фактор или указанный комплекс.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать биологическую активность ангиогенного фактора или комплекса, содержащего ангиогенный фактор.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент представляет собой антагонист одного или более путей передачи сигнала, которые активируются передачей сигнала посредством рецепторов, содержащих рецептор ангиогенного фактора.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать передачу сигнала, опосредуемую ангиогенным фактором, до менее чем 100%, например, одно из 99% или менее, 95% или менее, 90% или менее, 85% или менее, 80% или менее, 75% или менее, 70% или менее, 65% или менее, 60% или менее, 55% или менее, 50% или менее, 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 25% или менее, 20% или менее, 15% или менее, 10% или менее, 5% или менее или 1% или менее от уровня передачи сигнала в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент способен уменьшать передачу сигнала, опосредуемую ангиогенным фактором, менее чем в 1 раз, например, одно из $\leq 0,99$ раза, $\leq 0,95$ раза, $\leq 0,9$ раза, $\leq 0,85$ раза, $\leq 0,8$ раза, $\leq 0,75$ раза, $\leq 0,7$ раза, $\leq 0,65$ раза, $\leq 0,6$ раза, $\leq 0,55$ раза, $\leq 0,5$ раза, $\leq 0,45$ раза, $\leq 0,4$ раза, $\leq 0,35$ раза, $\leq 0,3$ раза, $\leq 0,25$ раза, $\leq 0,2$ раза, $\leq 0,15$ раза, $\leq 0,1$ раза от уровня передачи сигнала в отсутствие агента (или в присутствии соответствующего контрольного агента).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения передача сигнала, опосредуемая ангиогенным фактором, может представлять собой передачу сигнала, опосредуемую связыванием ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора (например, рецептором или лигандом для ангиогенного фактора). Такая передача сигнала может быть исследована, например, путем обработки клеток, экспрессирующих партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора, с ангиогенным фактором, либо путем стимулирования выработки ангиогенного фактора в клетках, которые экспрессируют партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

ИК₅₀ агента в отношении ингибирования передачи сигнала, опосредуемой ангиогенным фактором, может быть определена, например, путем культивирования клеток, экспрессирующих партнера по взаимодействию для рецептора ангиогенного фактора, в присутствии ангиогенного фактора и агента, и измерения функциональных последствий передачи сигнала, опосредуемой ангиогенным фактором. Например, в анализе пролиферации клеток, опосредуемой ангиогенным фактором, может быть исследовано включение ³H-тимидина в ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может проявлять ИК₅₀ 10 мкг/мл или менее, предпочтительно одно из ≤ 5 мкг/мл, ≤ 4 мкг/мл, $\leq 3,5$ мкг/мл, ≤ 3 мкг/мл, ≤ 2 мкг/мл, ≤ 1 мкг/мл, $\leq 0,9$ мкг/мл, $\leq 0,8$ мкг/мл, $\leq 0,7$ мкг/мл, $\leq 0,6$ мкг/мл или $\leq 0,5$ мкг/мл в таком анализе.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения агент может быть способен ингибировать процесс, опосредуемый ангиогенным фактором (например, после стимуляции с применением VEGF). Процессы, опосредуемые ангиогенным фактором, включают, например, прорастание, разрастание капилляров и экспрессию гена/белка, например, коллагена и ангиогенного фактора, и могут быть оценены как *in vitro*, так и *in vivo*.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора представляет собой ингибитор ангиогенеза, выбранный из: эндостатина (NP_569711.2 GI: 206597445), пролактина (CAA38264.1 GI: 531103), T2-TrpRS (описанного в Otani A et al., *A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002;99(1):178-183, которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки) или вазостатина (AAL13126.1 GI: 16151097), или их фрагмента, изоформы, гомолога или варианта.

Терапевтические и профилактические способы

Согласно настоящему изобретению предложены способы и композиции для лечения/предотвращения фиброза (в частности, фиброза глаза) с помощью антагонистического действия на опосредуемую IL-11 передачу сигнала и антагонистического действия на ангиогенез. Также предложены способы и композиции для лечения/предотвращения ангиогенеза с помощью антагонистического действия на опосредуемую IL-11 передачу сигнала и антагонистического действия на ангиогенез.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения заболевание/состояние, подлежащее лечению/предотвращению в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется увеличением уровня опосредуемой IL-11 передачи сигнала и/или ангиогенеза, например, в органе/ткани, которые поражены заболеванием/состоянием (например, в органе/ткани, в которых проявляются симптомы заболевания/состояния).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения заболевание/состояние, подлежащее лечению/предотвращению, может характеризоваться увеличением одного или более из указанных далее в органе/ткани/у субъекта, пораженных заболеванием, например, по сравнению с нормальным (т. е. непораженным) органом/тканью/субъектом: IL-11, IL-11R α , TGF β , VEGF, FGF, PDGF, VEGFR, FGFR или PDGFR.

Лечение может эффективно предотвращать прогрессирующее заболевание/состояние, например, уменьшать/задерживать/предотвращать ухудшение

заболевания/состояния или уменьшать/задерживать/предотвращать развитие заболевания/состояния. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лечение может привести к улучшению заболевания/состояния, например, уменьшению степени тяжести, и/или обращению, симптомов заболевания/нарушения.

5 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лечение может увеличить выживаемость. Предотвращение может относиться к предотвращению развития заболевания/состояния и/или предотвращению ухудшения заболевания/состояния, например, предотвращению прогрессирования заболевания/состояния до более поздней или хронической стадии.

10 Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения заболевание/состояние, подлежащее лечению/предотвращению, представляет собой хориоидальную неоваскуляризацию (CNV) и/или возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), например, «влажную» AMD.

Введение

15 Агенты в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно вводят в «терапевтически эффективном» или «профилактически эффективном» количестве, достаточном для того чтобы принести пользу субъекту.

Фактическое вводимое количество, а также скорость и временная динамика введения будут зависеть от характера и степени тяжести заболевания/состояния, а также характера
20 агента. Назначение лечения, например, принятие решений о дозировке и т. д., находится в пределах ответственности врачей общей практики и других врачей и, как правило, учитывает заболевание/состояние, подлежащее лечению, состояние отдельного субъекта, место доставки, способ введения и другие факторы, известные практикующим врачам. Примеры методик и протоколов, упомянутых выше, можно найти в Remington's
25 Pharmaceutical Sciences, 20 изд., 2000, pub. Lippincott, Williams & Wilkins.

В терапевтических приложениях агенты, способные оказывать антагонистическое действие на опосредуемую IL-11 передачу сигнала, и агенты, способные оказывать антагонистическое действие на ангиогенный фактор, предпочтительно изготовлены в виде лекарственного средства или фармацевтического средства вместе с одним или более
30 другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые носители, адъюванты, вспомогательные вещества, разбавители, наполнители, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазки, стабилизаторы, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества (например, смачивающие агенты),

маскирующие агенты, окрашивающие агенты, ароматические агенты и подслащающие агенты.

В настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т.д., которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для применения в контакте с тканями рассматриваемого субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, адъювант, вспомогательное вещество и т. д. также должен быть «приемлемым» в плане совместимости с другими ингредиентами состава.

Подходящие носители, адъюванты, вспомогательные вещества и т. д. можно найти в стандартных фармацевтических руководствах, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 изд., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2 изд., 1994.

Составы могут быть получены с помощью любых способов, хорошо известных в области фармации. Такие способы включают этап объединения активного соединения с носителем, который представляет собой один или более дополнительных ингредиентов. Обычно составы получают путем равномерного и тщательного объединения активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонкодисперсным твердым носителем и т. д.) с последующей формовкой продукта, если необходимо.

Составы могут быть получены для введения, подходящего для заболевания/состояния, подлежащего лечению. Например, составы могут быть изготовлены для местного, парентерального, системного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, интратекального, внутриглазного, местного глазного (например, субконъюнктивального, интравитреального, ретробульбарного, внутрикамерного), интраконъюнктивального, подкожного, перорального или трансдермального путей введения, которые могут включать инъекцию. Составы для инъекций могут содержать выбранный агент в стерильной или изотонической среде. В конкретных вариантах реализации составы изготовлены для глазного введения.

Аспекты настоящего изобретения включают композиции и способы, в которых содержится/применяется антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора.

«Комбинации», применительно к настоящей заявке, включают продукты и композиции (например, фармацевтические композиции), содержащие компоненты

комбинации. «Комбинации» также включают терапевтические схемы, в которых применяются компоненты комбинации.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компоненты комбинации обеспечены в отдельных композициях. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в композиции обеспечено более одного компонента комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компоненты комбинации обеспечены в одной композиции.

Аналогичным образом, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компоненты комбинации вводят по отдельности. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компонент комбинации вводят с другим компонентом комбинации. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения компоненты комбинации вводят вместе.

В качестве иллюстрации, в примере комбинации, содержащей антагонистическое антитело к IL-11 и антагонистическое антитело к VEGF, антитело к IL-11 и антитело к VEGF могут быть введены вместе или могут быть введены по отдельности (например, последовательно).

Если компоненты комбинации вводят вместе, введение может представлять собой одновременное введение. Если компоненты комбинации вводят по отдельности, введение может представлять собой одновременное введение или последовательное введение.

В настоящей заявке предложен антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала для применения в способе лечения или предотвращения фиброза и/или ангиогенеза, причем указанный способ включает раздельное или одновременное введение субъекту антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Также предложен антагонист ангиогенного фактора для применения в способе лечения или предотвращения фиброза и/или ангиогенеза, причем указанный способ включает раздельное или одновременное введение субъекту антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Также предложено применение антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала в изготовлении лекарственного средства для применения в способе, включающем раздельное или одновременное введение субъекту антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Также предложено применение антагониста ангиогенного фактора в изготовлении лекарственного средства для применения в способе, включающем раздельное или одновременное введение субъекту антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.

Одновременное введение относится к введению агентов вместе, например, в виде фармацевтической композиции, содержащей агенты (т. е. комбинированного препарата), или непосредственно один за другим и необязательно с помощью одного и того же пути введения, например, в одну и ту же артерию, вену или другой кровеносный сосуд. В конкретных вариантах реализации онколитический вирус и вирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуномодулирующий фактор, могут быть введены одновременно в комбинированном препарате. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения при одновременном введении два или более агентов могут быть введены за счет разных путей введения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одновременное введение относится к введению в одно и то же время или в течение, например, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов или 48 часов.

Последовательное введение относится к введению одного или более агентов, за которым через определенный интервал времени следует отдельное введение другого из агентов. Введение двух агентов одним и тем же путем не требуется, несмотря на то, что это имеет место в некоторых вариантах реализации. Интервал времени может представлять собой любой интервал времени, включая часы, дни, недели, месяцы или годы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательное введение относится к введениям, разделенным интервалом времени, таким как одно из по меньшей мере 10 минут, 30 минут, 1 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 6 недель, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев или 6 месяцев.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения лечение может дополнительно включать другое терапевтическое или профилактическое вмешательство, например, операцию. Такое другое терапевтическое или профилактическое вмешательство может происходить до, во время и/или после введения терапевтических средств, предусмотренных настоящим изобретением, и доставки других терапевтических или профилактических вмешательств могут происходить за счет тех же или иных путей введения, что и терапевтических средств согласно настоящему изобретению.

Может быть обеспечено несколько доз агентов (антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала, антагониста ангиогенного фактора, композиций, комбинаций и т. д.) согласно настоящему изобретению. Одна или более, или каждая из доз могут сопровождаться одновременным или последовательным введением другого терапевтического агента.

Несколько доз могут быть разделены заранее определенным интервалом времени, который может быть выбран из одного из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 или 31 дня или 1, 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев. Например, дозы могут быть введены один раз каждые 7, 14, 21 или 28 дней (плюс-минус 3, 2 или 1 день).

Функциональные свойства комбинированного лечения

Комбинации и способы согласно настоящему изобретению могут быть определены с помощью ссылки на одно или более функциональных свойств и/или эффектов, и могут быть оценены в отношении таких свойств/эффектов, например, с помощью исследования, описанного в экспериментальных примерах.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинация антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора может обладать одним или более из следующих функциональных свойств:

- Улучшенная способность уменьшать фиброз (например, ретинальный фиброз) по сравнению со способностью уменьшать фиброз (например, ретинальный фиброз) с помощью любого компонента, применяемого по отдельности.
- Способность уменьшать фиброз (например, ретинальный фиброз), которая является синергической (т. е. сверхаддитивной) по сравнению со способностью уменьшать фиброз (например, ретинальный фиброз) с помощью компонентов, применяемых по отдельности.
- Способность уменьшать фиброз (например, ретинальный фиброз) дозозависимым образом.
- Улучшенная способность предотвращать фиброз (например, ретинальный фиброз) по сравнению со способностью предотвращать фиброз (например, ретинальный фиброз) с помощью любого компонента, применяемого по отдельности.
- Улучшенная способность уменьшать ангиогенез по сравнению со способностью уменьшать ангиогенез с помощью любого компонента, применяемого по отдельности.
- Способность уменьшать ангиогенез, которая является синергической (т. е. сверхаддитивной) по сравнению со способностью уменьшать ангиогенез с помощью компонентов, применяемых по отдельности.
- Способность уменьшать ангиогенез дозозависимым образом.
- Улучшенная способность предотвращать ангиогенез по сравнению со способностью предотвращать ангиогенез с помощью любого компонента, применяемого по отдельности.

• Улучшенная способность уменьшать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)) по сравнению со способностью уменьшать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)) с помощью любого компонента, применяемого по

отдельности.

• Способность уменьшать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)), которая является синергической (то есть сверхаддитивной) по сравнению со способностью уменьшать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)) с помощью

компонентов, применяемых по отдельности.

• Способность уменьшать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)) дозозависимым образом.

• Улучшенная способность предотвращать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)) по сравнению со способностью предотвращать субретинальную неоваскуляризацию (например, хориоидальную неоваскуляризацию (CNV)) с помощью любого компонента, применяемого по

отдельности.

Исследование способности уменьшать/предотвращать фиброз, ангиогенез и/или субретинальную неоваскуляризацию можно оценить, например, *in vivo*, с помощью исследования, описанного в экспериментальных примерах. Например, комбинация антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора может уменьшать хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), которую оценивают с помощью флуоресцентной ангиограммы глазного дна (FFA) и/или оптической когерентной томографии заднего сегмента (PS-OCT). Комбинация также может привести к уменьшению площади фиброза сетчатки, наблюдаемой при гистопатологическом исследовании или при иммунофлуоресцентном окрашивании и исследовании. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения комбинация обладает улучшенной способностью уменьшать протекание кровеносных сосудов по сравнению со способностью уменьшать протекание кровеносных сосудов с помощью любого

компонента, применяемого по отдельности.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист IL-11 передачи сигнала способен улучшать эффективность антагониста ангиогенного фактора. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антагонист ангиогенного фактора способен улучшать эффективность антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала.

Композиции/продукты/наборы

Согласно настоящему изобретению также предложены композиции, содержащие антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала, описанный в настоящей заявке, и антагонист ангиогенного фактора, описанный в настоящей заявке. Комбинации согласно
5 настоящему изобретению могут быть обеспечены в виде одной композиции или могут быть обеспечены в виде нескольких композиций, содержащих компоненты комбинации.

Согласно настоящему изобретению также предложен набор компонентов, содержащий антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала, описанный в настоящей заявке, и антагонист ангиогенного фактора, описанный в настоящей заявке, или
10 композицию в соответствии с настоящим изобретением.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения набор может иметь по меньшей мере один контейнер, содержащий заранее определенное количество антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала, описанного в настоящей заявке, антагониста ангиогенного фактора, описанного в настоящей заявке, или композиции в
15 соответствии с настоящим изобретением. Набор может иметь контейнеры, содержащие отдельные компоненты комбинаций согласно настоящему изобретению, или может иметь контейнеры, содержащие комбинации из компонентов комбинаций согласно настоящему изобретению.

Набор может обеспечивать антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала, антагонист ангиогенного фактора или композицию с инструкциями по введению
20 пациенту для лечения фиброза (например, фиброза глаза). Антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала, антагонист ангиогенного фактора или композиция могут быть изготовлены так, чтобы быть подходящими для глазного введения.

Субъекты

Субъекты могут представлять собой животное или человека. Субъекты предпочтительно представляют собой млекопитающее, более предпочтительно человека. Субъект может представлять собой млекопитающее, не являющееся человеком, но более предпочтительно представляет собой человека. Субъект может представлять собой субъекта мужского или женского пола. Субъект может представлять собой пациента.
30 Пациент может иметь заболевание/состояние, описанное в настоящей заявке. У субъекта может быть диагностировано заболевание/состояние, требующее лечения, он предположительно может иметь такое заболевание/состояние или может быть подвержен риску развития такого заболевания/состояния.

В вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением субъект
35 предпочтительно представляет собой субъекта-человека. Согласно некоторым вариантам

реализации настоящего изобретения субъект, подлежащий лечению в соответствии с терапевтическим или профилактическим способом согласно настоящему изобретению, представляет собой субъекта, который имеет или который подвержен риску развития заболевания/состояния, описанного в настоящей заявке. В вариантах реализации в соответствии с настоящим изобретением субъект может быть отобран для лечения в соответствии со способами на основании характеристики определенных маркеров такого заболевания/нарушения. У субъекта может быть диагностировано заболевание или нарушение, требующее лечения, или он предположительно может иметь такое заболевание или нарушение.

Идентичность последовательности

Попарное выравнивание и выравнивание нескольких последовательностей для целей определения процента идентичности между двумя или более последовательностями аминокислот или нуклеиновых кислот может быть достигнуто различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение ClustalOmega (Söding, J. 2005, Bioinformatics 21, 951-960), T-coffee (Notredame et al. 2000, J. Mol. Biol. (2000) 302, 205-217), Kalign (Lassmann and Sonnhammer 2005, BMC Bioinformatics, 6(298)) и MAFFT (Katoh and Standley 2013, Molecular Biology and Evolution, 30(4) 772–780). При использовании такого программного обеспечения предпочтительно используют параметры по умолчанию, например, для штрафа за введение пропуска и штрафа за удлинение пропуска.

Последовательности

SEQ ID NO:	ОПИСАНИЕ	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
1	IL-11 человека (UniProt P20809)	MNCVCRLVLVVLSPDTAVAPGPPPGPPRVSPDPRAEL DSTVLLTRSLADTRQLAAQLRDKFPADGDHNLDLPTL AMSAGALGALQLPGVLRRLRADLLSYLRHVQWLRRAG GSSLKTLEPELGTQLARLDRLRLRLQLLMSRLALPQPPD PPAPPLAPPSSAWGGIRAAHAILGGLHLTLDWAVRGLLL LKTRL
2	gp130 человека (UniProt P40189-1)	MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLPCGYISPESPVVQL HSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFPTIPKEQ YTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYGITII SGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDGGRETHLETNFTL

		KSEWATHKFA DCKAKRDTPT SCTVDYSTVYFVNIEVWV EAENALGKVTSDHINFD PVYKVKPNPPHNLSVINSEELSS ILKLTW TNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTAS TRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEA SGITYEDRPSKAPSFYWKIDPSHTQGYRTVQLVWKTLP FEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLTND RYLATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKA FPKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDW QQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPES IKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQ NGFIRNYTIFYRTIIGNETA VNVDSSTHEYTLSSLTSDTLY MVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCL AFLTTLGLGVLCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWS PHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKPFPE DLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSDEN ESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPL LDSEERPEDLQLVDHVDGGDILPRQQYFKQNCSQHES PDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQM KMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMP KSYLPQTVRQGGYMPQ
3	IL11RA человека (UniProt Q14626)	MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSPCPQAWGPPGVQYG QPGRSVKLCCPGVTAGDPVSWFRDGE PKLLQGPDSGLG HELVLAQADSTDEGTYICQTL DGALGGTVTLQLGYPPA RPVVSCQAADYENFSC TWSPSQISGLPTRYLTSYRKKT TVLGADSQRRSPSTGPWPCPDPLGAARCVVHGAEFWSQY RINVTEVNPLGASTRLLDVSLQ SILRPDPPQGLRVESVPG YPRRLRASWTYPASWPCQPHFLLKFRLQYRPAQH PAWS TVEPAGLEEVI TDAVAGLPHAVRV SARDFLDAGTWSTW SPEAWGTPSTGTIPKEIPAWGQLHTQPEVEPQVDSPAPPR PSLQPHPRLLDHRDSVEQVAVLASLGILSFLGLVAGALA LGLWLRLRRGGKDGSPKPGFLASVIPVDRRPGAPNL
4	Мишень миРНК в IL-11	CCTTCCAAAGCCAGATCTT
5	Мишень миРНК в IL-11	GCCTGGGCAGGAACATATA

6	Мишень миРНК в IL-11	CCTGGGCAGGAACATATAT
7	Мишень миРНК в IL-11	GGTTCATTATGGCTGTGTT
8	Мишень миРНК в IL-11R α	GGACCATAACCAAAGGAGAT
9	Мишень миРНК в IL-11R α	GCGTCTTTGGGAATCCTTT
10	Мишень миРНК в IL-11R α	GCAGGACAGTAGATCCCT
11	Мишень миРНК в IL-11R α	GCTCAAGGAACGTGTGTAA
12	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	CCUUCCAAAGCCAGAUCUdTdT-AAGAUCUGGCUUUGGAAGGdTdT
13	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	GCCUGGGCAGGAACAUAUAdTdT-UAUAUGUUCCUGCCCAGGCdTdT
14	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	CCUGGGCAGGAACAUAUAUdTdT-AUAUAUGUUCCUGCCCAGGdTdT
15	миРНК к IL-11 (NM_000641.3)	GGUUCAUUAUGGCUGUGUdTdT-AACACAGCCAUAUAUGAACcdTdT
16	миРНК к IL-11R α (U32324.1)	GGACCAUACCAAAGGAGAUdTdT-AUCUCCUUUGGUAUGGUCCdTdT
17	миРНК к IL-11R α (U32324.1)	GCGUCUUUGGGAAUCCUUdTdT-AAAGGAUUCCCAAAGACGCdTdT
18	миРНК к IL-11R α (U32324.1)	GCAGGACAGUAGAUCUUAdTdT-UAGGGAUCUACUGUCCUGCdTdT
19	миРНК к IL-11R α (U32324.1)	GCUCAAGGAACGUGUGUAAdTdT-UUACACACGUUCCUUGAGCdTdT
20	VEGF-A человека (UniProtKB - P15692)	MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQAAPMAEGGGQN HHEVVVKFMDVYQRSYCHPIETLVDIFQEYPDEIEYIFKPS CVPLMRCGGCCNDEGLECVPTESNITMQIMRIKPHQGG HIGEMSFLQHNCCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQK RKRKKSRYSWSVYVGARCCCLMPWSLPGPHPCGPCSER RKHLFVQDPQTCKCCKNTDSRCKARQLELNERTCRCD

		KPRR
21	VEGFR-1 человека (UniProtKB - P17948)	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLKDPESLKG QHIMQAGQTLHLQCRGEAAHKWSLPEMVSKESERLSIT KSACGRNGKQFCSTLTLNTAQANHTGFYSCKYLA VPTS KKKETESA IYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVIP CRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNAT YKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVQISTPR PVKLLRGHTLVLNCTATTPLNTRVQMTWSYPDEKNKRA SVRRRIDQSN SHANIFYSVLTIDKMQN KDKGLYTCRVRS GPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRKQQVLETVAGKRSYR LSMKVKAFPSPEVWVLKDGLPATEKSARYLTRGYSIIK DVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVNVKPQIYEK AVSSFDPALYPLGSRQILTCTAYGIPQPTIKWFWHPCNH NHSEARCD FCSNNEESFILDADSNMGNRIESITQRM AII GKNKMASTLVVADSRISGIYICIASNKVGTVGRNISFYIT DVPNGFHV NLEKMPTEGEDLKL SCTVNKFLYRDVTWIL LRTVNNRTMHYSISKQKMAITKEHSITLNLTIMNVSLQD SGTYACRARNVYTGEEILQKKEITIRDQEAPYLLRNLS HTVAISSSTLDCHANGVPEPQITWFKNNHKIQQEPGIL GPGSSTLFIERVTEEDEGVYHCKATNQKGSVESSAYLTV QGTSDKSNLELITLTCTCVAATLFWLLTLFIRKMKRSSS EIKTDYLSIIMDPDEVPLDEQCERLPYDASKWEFARERLK LGKSLGRGAFGKV VQASAFGIKKSPTCRTVAVKMLKEG ATASEYKALMTELKILTHIGHHLNVVNLLGACTKQGGP LMVIVEYCKYGNLSNYLKSKRDLFFLNKDAALHMEPKK EKMEPGLEQGGKPRLDSVTSSSEFASSGFQEDKSLSDVE EEEDSDGFYKEPITMEDLISYSFQVARGMEFLSSRKCIHR DLAARNILLSENN VVKICDFGLARDIYKNPDYVRKGDTR LPLKWMAPESIFDKIYSTKSDVWSYGVLLWEIFSLGGSP YPGVQMD EDFCSRLREGMRMRAP EYSTPEIYQIMLDCW HRDPKERPRFAELVEKLGDLLQANVQQDGKDYIPINAIL TGNSGFTYSTPAFSEDFFKESISAPKFNSGSSDDVRYVNA FKFMSLERIKTFEELLPNATSMFDDYQGDSSTLLASPML KRFTWTD SKPKASLKIDLRVTSKSKESGLSDVSRPSFCHS SCGHVSEGKRRFTYDHAELERK IACCSPPPDYNSVVLYS

		TPPI
22	VEGFR-2 человека (UniProtKB - P35968)	MQSKVLLAVALWLCVETRAASVGLPSVSLDLPRLSIQK DILTIKANTTLQITCRGQRDLDWLWPNNQSGSEQRVEVT ECSDGLFCKTLTIPKVIGNDTGAYKCFYRETDLASVIYVY VQDYRSPFIASVSDQHGVVYITENKNKTVVIPCLGSISNL NVSLCARYPEKRFVPDGNRISWDSKKGFTIPSYMISYAG MVFCEAKINDESYQSIMYIVVVVGYRIYDVVLSPSHGIEL SVGEKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVN RDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGL MTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIP AKYLGYPPEIKWYKNGIPLESNHTIKAGHVLTIMEVSER DTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLVVYVPPQIGEKSLISPV DSYQYGTTQTLTCTVYAIPPPHHIHWYWQLEEECANEPS QAVSVTNPYPCEEWRSVEDFQGGNKIEVNKNQFALIEG KNKTVSTLVIQAANVSALYKCEAVNKVGRGERVISFHV TRGPEITLQPDMQPTEQESVSLWCTADRSTFENLTWYKL GPQPLPIHV GELPTPVCKNLDLWKLNATMFSNSTNDILI MELKNASLQDQGDYVCLAQDRKTKKRHCVVRQLTVLE RVAPTITGNLENQTTSIGESIEVSCTASGNPPPQIMWFKD NETLVEDSGIVLKDGNRNLTIRRVKEDEGLYTCQACSV LGC AKVEAFFIIEGAQEKTNLEIILVGTAVIAMFFWLLL IILRTVKRANGGELKTGYLSIVMDPDELPLDEHCERLPYD ASKWEFPRDRLKLGKPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATC RTVAVKMLKEGATHSEHRALMSELKILIHIGHHLNVVNL LGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVPYKT KGARFRQGKDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGFVEE KSLSDVEEEEAPEDLYKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFL ASRKCIHRDLAARNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPD YVRKGDARLPLKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSFGVLLW EIFSLGASPYPGVKIDEEFCRRLKEGTRMRAPDYTTPEM YQTMLDCWHGEPSQRPTFSELVEHLGNLLQANAQQDG KDYIVLPISETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEVCDPKF HYDNTAGISQYLQNSKRKSRPVS VKTFEDIPLEEPEVKVI PDDNQTDSGMVLASEELKTLEDRTKLSPSFGGMVPSKSR ESVASEGSNQTSGYQSGYHSDDTDTTVYSSEEAECLKLI

		EIGVQTGSTAQILQPDSGTTLSSPPV
23	VEGFR-3 человека (UniProtKB - P35916)	MQRGAALCLRLWLCLGLLDGLVSGYSMTPTLNITEES HVIDTGDSLISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSE DTGVVRDCEGTDARPYCKVLLLHEVHANDTGSYVCYY KYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLVNRKDA MWVPCLVSIPGLNVTLSQSSVLWPDGQEVVWDDRRG MLVSTPLLHDALYLQCETTWGDQDFLSNPFLVHITGNEL YDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWD YPGKQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLG SYVCKANNGIQRFRESTEIVIHENPFISVEWLKGPILEAT AGDELVKLPVKLAAYPPPEFQWKDGKALSGRHSPHAL VLKEVTEASTGTYTALWNSAAGLRRNISLELVVNPPQ IHEKEASSPSIYSRHSRQALTCTAYGVPLPLSIQWHWRP WTPCKMFAQRSLRRRQQQDLMPQCRDWRAVTTQDAV NPIESLDTWTEFVEGKNKTVSKLVIQNANVSAMYKCVV SNKVGQDERLIYFYVTTIPDGFTIESKPSEELLEGQPVLLS CQADSYKYEHLRWYRLNLSTLHDAHGNPLLLDCKNVH LFATPLAASLEEVAPGARHATLSLSIPRVAPEHEGHYVCE VQDRRSHDKHCHKKYL SVQALEAPRLTQNLTDLLVNVS DSLEMQCLVAGAHAPSIVWYKDERLLEEKSGVDLADSN QKLSIQRVREEDAGRYLCSVCNAKGCVNSSASVAVEGS EDKGSMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNMRRPAHADI KTGYLSIIMDPGEVPLEEQCEYLSYDASQWEFPRERLHL GRVLGYGAFGKVVEASAFGIHKGSSCDTVAVKMLKEG ATASEHRALMSELKILIHIGNHLNVNLLGACTKPQGPL MVIVEFCKYGNLSNFLRAKRDAFSPCAEKSPEQRGRFRA MVELARLD RRRPGSSDRVLFARFSKTEGGARRASPDQE AEDLWLSPLTMEDLVCYSFQVARGMEFLASRKCIHRDL AARNILLS ESDVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGSARLP LKWMAPE SIFDKVYTTQSDVWSFGVLLWEIFSLGASPY GVQINEEFCQRLRDGTRMRAPELATPAIRRIMLNCWSGD PKARPAFSELVEILGDLLQGRGLQEEEEVCMAPRSSQSSE EGSFSQVSTMALHIAQADAEDSPPSLQRHSLAARYYNW VSFPGCLARGAETRGSSRMKTFEEFPMTPPTYKGSVDNQ TDSGMVLASEEFEQIESRHRQESGFSCKGPGQNVAVTRA

		HPDSQGRRRRPERGARGGQVFYNSEYGELSEPSEEDHCS PSARVTFFTDNSY
24	Афлиберцепт	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTL KKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEAT VNGHLYKTNLYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLV NCTARTELVGIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSG SEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTF VRVHEKDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSP G

Пронумерованные пункты

Следующие пронумерованные параграфы (пункты) описывают конкретные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения:

- 5 1. Способ лечения или предотвращения фиброза у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.
2. Комбинация антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора для применения в способе лечения или предотвращения фиброза.
- 10 3. Применение антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора в изготовлении лекарственного средства для применения в способе лечения или предотвращения фиброза.
4. Способ по п. 1, комбинация для применения по п. 2 или применение по п. 3, отличающиеся тем, что указанный фиброз представляет собой фиброз в глазу.
- 15 5. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-4, отличающиеся тем, что указанный фиброз выбран из офтальмопатии Грейва, эпиретинального фиброза, ретинального фиброза, идиопатического премакулярного фиброза, субретинального фиброза (например, ассоциированного с отслоением сетчатки или дегенерацией желтого пятна (например, влажной возрастной дегенерацией желтого
- 20 пятна (AMD)), диабетической ретинопатии, глаукомы, географической атрофии, фиброза

роговицы, послеоперационного фиброза (например, задней капсулы после операции по удалению катаракты или фильтрационной подушки после трабекулэктомии при глаукоме), конъюнктивального фиброза или субконъюнктивального фиброза.

6. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-5, отличающиеся тем, что указанный фиброз представляет собой ретинальный фиброз, эпиретинальный фиброз или субретинальный фиброз.

7. Способ по п. 1, комбинация для применения по п. 2 или применение по п. 3, отличающиеся тем, что указанный фиброз представляет собой фиброз сердца, фиброз печени или фиброз почек.

8. Способ, комбинация для применения или применение по п. 7, отличающиеся тем, что указанный фиброз локализован:

в печени и ассоциирован с хроническим заболеванием печени или циррозом печени;

в почке и ассоциирован с хроническим заболеванием почек; или

в сердце и ассоциирован с дисфункцией мышечной ткани или электрических свойств сердца или утолщением стенок или клапанов сердца.

9. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-8, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор выбран из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF).

10. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-9, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор представляет собой VEGF.

11. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-10, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с рецептором IL-11.

12. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-11, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.

13. Способ, комбинация для применения или применение по п. 12, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.

14. Способ, комбинация для применения или применение по п. 13, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой антитело к IL-11 или антитело к IL-11R α .
- 5 15. Способ, комбинация для применения или применение по п. 13, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
16. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-10, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала способен уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.
- 10 17. Способ, комбинация для применения или применение по п. 16, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
18. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-17, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
- 15 19. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-18, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
- 20 20. Способ, комбинация для применения или применение по п. 19, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
- 25 21. Способ, комбинация для применения или применение по п. 20, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой антитело к VEGF или антитело к рецептору VEGF.
22. Способ, комбинация для применения или применение по п. 20, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку VEGF.
- 30 23. Способ, комбинация для применения или применение по п. 22, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой афлиберцепт.
24. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-17, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора способен уменьшать

экспрессию ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

25. Способ, комбинация для применения или применение по п. 24, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.

26. Комбинация, содержащая антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора.

28. Набор компонентов, содержащий заранее определенное количество антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора, комбинации по п. 26 или фармацевтической композиции по п. 27.

29. Комбинация по п. 26, фармацевтическая композиция по п. 27 или набор компонентов по п. 28, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор выбран из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF).

30. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-29, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор представляет собой VEGF.

31. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-30, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с рецептором IL-11.

32. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-31, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.

33. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 32, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.

34. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 33, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой антитело к IL-11 или антитело к IL-11R α .

35. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 33, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
36. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из
5 пп. 26-30, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала способен уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.
37. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 36, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
- 10 38. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-37, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
39. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из
15 пп. 26-38, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
40. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 39, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора выбран из группы,
20 состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
41. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 40, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой антитело к VEGF или антитело к рецептору VEGF.
- 25 42. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 40, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку VEGF.
43. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 42, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой
30 афлиберцепт.
44. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-37, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора способен уменьшать экспрессию партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.

45. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 44, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.

5 Настоящее изобретение включает комбинацию описанных аспектов и предпочтительных признаков, за исключением случаев, когда такая комбинация явно недопустима или явным образом исключена.

10 В настоящей заявке заголовки разделов предназначены только для организационных целей и не должны быть истолкованы, как ограничивающие описанный объект изобретения.

Аспекты и варианты реализации настоящего изобретения далее будут проиллюстрированы, в качестве примера, со ссылкой на прилагаемые фигуры. Дополнительные аспекты и варианты реализации будут понятны специалистам в данной области техники. Все документы, упомянутые в данном тексте, включены в настоящую
15 заявку посредством ссылки.

По всему тексту описания, включая формулу изобретения ниже, если контекст не требует иного, слово «содержать» и варианты, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать, как подразумевающие включение указанного целого числа или этапа, либо группы целых чисел или этапов, но не исключение любого другого целого числа или
20 этапа либо группы целых чисел или этапов.

Следует отметить, что в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа (соотв. «a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) включают множественное число объектов, если контекст явно не требует иного. В настоящей заявке диапазоны могут быть выражены как от «примерно» одного
25 конкретного значения и/или до «примерно» другого конкретного значения. В случае если диапазон выражен таким образом, другой вариант реализации включает от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения выражены как приближения с использованием антецедента «примерно», следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант реализации.

30 Если в настоящей заявке раскрыта последовательность нуклеиновой кислоты, также явным образом подразумевается ее обратнoкомплементарная последовательность.

Способы, описанные в настоящей заявке, предпочтительно могут быть выполнены *in vitro*. Термин «*in vitro*» предназначен для включения процедур, выполняемых с клетками в культуре, в то время как термин «*in vivo*» предназначен для включения процедур с/на
35 интактных многоклеточных организмах.

Краткое описание фигур

Варианты реализации и эксперименты, иллюстрирующие принципы настоящего изобретения, далее будут обсуждаться со ссылкой на прилагаемые фигуры.

Фигура 1. Экспериментальный план комбинированного лечения антителом к VEGF и антителом к IL-11.

Фигура 2. Исследование с помощью флуоресцентной ангиограммы глазного дна (FFA) индуцированной лазером хориоидальной неоваскуляризации (CNV), наблюдаемой *in vivo* через 7 и 28 дней после индуцированного лазером разрыва мембраны Бруха. (a) Измерения показывают степень CNV до и после интравитреальных инъекций (ИВИ) антитела к VEGF и антитела к IL-11, данные представляют собой среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего значения (SEM); (b) На график нанесена площадь протекания после обработки антителом из (a); мы наблюдаем дозозависимый эффект антитела к IL-11 в отношении уменьшения CNV в комбинации с эйлеа; (c) Изображения FFA для контрольной комбинированной терапии (эйлеа + IGG), комбинированной терапии с высокой дозировкой (2 мкг) и низкой дозировкой (0,5 мкг) эйлеа + антитело к IL-11 через 7 и 28 дней.

Фигура 3. Визуализация структуры сетчатки с помощью оптической когерентной томографии заднего сегмента (PS-OCT) субъектов, проходивших контрольную комбинированную терапию (эйлеа + IGG), комбинированную терапию с высокой дозировкой (2 мкг) или низкой дозировкой (0,5 мкг) эйлеа + антитело к IL-11.

Фигура 4. Гистологические изображения фиброза на день 28 эксперимента. (a) Типичные гистологические изображения фиброза, показывающие, что лазерное повреждение привело к образованию фиброзного рубца, размер которого был значительно уменьшен при лечении антителом к IL-11, и что этот эффект более выражен при комбинированном лечении. (b) Площадь фиброза определяли количественно с использованием программного обеспечения ImageJ; двусторонний критерий Даннета; На диаграммах размаха показана медиана (средняя линия), 25–75 перцентили («ящик») и 10–90 перцентили («усы»).

Фигура 5. Изображения фиброза после иммунофлуоресцентного окрашивания (α -SMA, DAPI) (40X) на день 28 эксперимента, показывающие, что лазерное повреждение привело к образованию фиброзного рубца, размер которого был значительно уменьшен при лечении антителом к IL-11, и что этот эффект более выражен при комбинированном лечении. (a) Изображения от индивидуумов 1-3, получавших эйлеа + контрольный IgG, комбинированную терапию с низкой дозировкой и комбинированную терапию с высокой дозировкой, соответственно. (b) Изображения от индивидуумов 4-6, получавших эйлеа +

контрольный IgG, комбинированную терапию с низкой дозировкой и комбинированную терапию с высокой дозировкой, соответственно.

Фигура 6. Количественный анализ изображений фиброза после окрашивания α -SMA (40X) на день 28 эксперимента, показывающий, что лазерное повреждение привело к образованию фиброзного рубца, размер которого был значительно уменьшен при лечении антителом к IL-11, и что этот эффект более выражен при комбинированном лечении; пунктирным контуром обозначена область фиброза. (a) Изображения от индивидуумов 1-3, получавших эйлеа + контрольный IgG, комбинированную терапию с низкой дозировкой и комбинированную терапию с высокой дозировкой, соответственно; нижние панели показывают верхнюю панель, обрезанную так, чтобы показать только область фиброза. (b) Изображения от индивидуумов 4-6, получавших эйлеа + контрольный IgG, комбинированную терапию с низкой дозировкой и комбинированную терапию с высокой дозировкой, соответственно; нижние панели показывают верхнюю панель, обрезанную так, чтобы показать только область фиброза.

Примеры

Пример 1: Материалы и методы

Мышей дикого типа C57BL/6J (WT) приобрели у InVivos (Сингапур). Животных размещали при цикле 12 часов света/12 часов темноты со свободным доступом к пище и воде. Содержание и уход за всеми животными выполняли в соответствии с руководящими принципами, одобренными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) SingHealth, Сингапур, и осуществляли в соответствии с рекомендациями Ассоциации исследований в области зрения и офтальмологии (ARVO) для экспериментов на животных.

Индукцированная лазером CNV:

4 участка лазерной фотокоагуляции располагали концентрично вокруг диска зрительного нерва обоих глаз, чтобы индуцировать CNV. Использовали диодный лазер (810 нм) с относительной шкалой мощности 120 мВт, временем воздействия 0,05 секунды и размером пятна 50 мкм. Лазерные пятна фокусировали с использованием кристаллических заглушек, чтобы избежать рассеивания лазерного луча. Образование пузырьков подтвердило разрыв мембраны Бруха.

Интравитреальная инъекция (ИВИ):

После анестезии животного глаза подвергали местной анестезии, помещая каплю 1% ксилокаина в конъюнктивальный мешок. В конъюнктивальный мешок помещали 5% раствор повидона йода. Интравитреальную инъекцию выполняли с использованием иглы 32 калибра. Тестируемые соединения вводили путем ИВИ в правые глаза. Все животные

находились под ежедневным наблюдением в клетке содержания для контроля клинических признаков плохого здоровья, включая любые глазные патологии.

Следующие средства лечения вводили путем ИВИ в дни 8 и 16 после обработки лазером:

5 *Эйлеа* + *IgG*: агент, направленный против VEGF, *эйлеа*, и *IgG* (изотипический контроль). Общий объем на инъекцию = 1 мкл.

Эйлеа + *антитело к IL-11 (низкая дозировка)*: комбинация *эйлеа* и антитела к *IL-11* (0,5 мкг в 1 мкл). Общий объем на инъекцию = 1 мкл.

10 *Эйлеа* + *антитело к IL-11 (высокая дозировка)*: комбинация *эйлеа* и антитела к *IL-11* (2 мкг в 1 мкл). Общий объем на инъекцию = 1 мкл.

За животными наблюдали два раза в день для выявления признаков потенциальных нежелательных явлений и один раз в день для качественной оценки потребления пищи. Массу животных регистрировали во время отбора животных для лазерного повреждения и каждую неделю на протяжении оставшейся части исследования.

15 На день 28 животных подвергали эвтаназии путем передозировки пентобарбитала для сбора крови и тканей.

Флуоресцентная ангиография глазного дна:

Флуоресцентную ангиографию глазного дна (FFA) визуализировали с помощью камеры для глазного дна MICRON IV (Phoenix Laboratories, США). Для FFA животным
20 вводили путем внутрибрюшинной инъекции 10% флуоресцеин натрия в дозе 0,01 мл на 5-6 г массы тела.

Структуру сетчатки контролировали в реальном времени с помощью оптической когерентной томографии заднего сегмента (PS-OCT).

Гистопатология и иммуногистохимия

25 Целый глаз мыши (28 дней, n = 10) энуклеировали и фиксировали в смеси 4% параформальдегида (ПФА) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в течение 24 часов. Затем целый глаз мыши обезвоживали в повышающейся концентрации этанола, очищали в ксилоле и заливали в парафин (Leica-Surgipath, Leica Biosystems Richmond, Inc.). Пятимикронные срезы нарезали с помощью роторного микротомы (RM2255, Leica
30 Biosystems Nussloch GmbH, Германия) и собирали на предметные стекла для микроскопа POLYSINE™ (Gerhard Menzel, Thermo Fisher Scientific, Ньюингтон, Коннектикут, США). Срезы высушивали в печи при 37°C в течение по меньшей мере 24 часов. Чтобы подготовить срезы для гистопатологического и иммуногистохимического исследования, срезы нагревали на нагревательной пластине при 60°C, депарафинизировали в ксилоле и
35 повторно гидратировали в уменьшающейся концентрации этанола. Также выполняли

рекомендуемую процедуру для трихромного окрашивания по Массону (26367-серия, Electron Microscopy Sciences) для исследования патологий соединительной ткани и мышц. Для исследования предметных стекол использовали световой микроскоп (Axioplan 2; Carl Zeiss Meditec GmbH, Оберкохен, Германия), и фиксировали изображения.

- 5 Одновременно с этим выполняли иммунофлуоресцентное окрашивание. Индуцированное нагреванием извлечение антигена выполняли путем инкубации срезов в буфере на основе цитрата натрия (10 мМ цитрата натрия, 0,05% твин 20, pH=6,0) в течение 20 минут при 95-100°C. Затем срезы охлаждали в буфере на основе цитрата натрия в течение 20 минут при комнатной температуре и трижды промыли каждый раз по
- 10 5 минут 1× фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Неспецифические сайты блокировали блокирующим раствором 5% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 0,1% тритоне X-100 и 1× ФСБ в течение 1 часа при комнатной температуре в увлажненной камере. Затем срезы кратковременно ополаскивали 1× ФСБ. Применяли специфичное первичное антитело, показанное в таблице 1, и инкубировали в течение ночи при 4°C в увлажненной
- 15 камере, приготовленной в блокирующем растворе. После двукратной промывки 1× ФСБ и один раз 1× ФСБ с 0,1% твин каждый раз в течение 10 минут вносили Alexa Fluor®594-конъюгированное, меченое флуоресцеином вторичное антитело, показанное в таблице 1 (Invitrogen-Molecular Probes, Юджин, Орегон, США), в концентрации 1:1000 в блокирующем растворе и инкубировали в течение 90 минут при комнатной температуре.
- 20 Затем срезы дважды промывали 1× ФСБ и один раз 1× ФСБ с 0,1% твин каждый раз в течение 5 минут, срезы фиксировали на предметных стеклах с помощью среды для заливки Prolong Diamond Anti-fade DAPI5 (Invitrogen- Molecular Probes, Юджин, Орегон, США) для визуализации ядра клетки. Для отрицательных контролей первичное антитело не добавляли.
- 25 Для исследования предметных стекол использовали флуоресцентный микроскоп (Axioplan 2; Carl Zeiss Meditec GmbH, Оберкохен, Германия), и фиксировали изображения. Эксперименты с антителом повторяли с двумя повторами.

Таблица 1.

Антитело	№ по каталогу	Компания	Концентрация
Альфа-актин гладких мышц (альфа-SMA)	ab5694	Abcam (Кембридж, Массачусетс, США)	1:100
Alexa Fluor 594 козий Ig против IgG	A11012	Invitrogen. Life Technologies	1:1000

(H+L) кролика		(Invitrogen, Юждин, Орегон, США)	
---------------	--	-------------------------------------	--

Пример 2: Флуоресцентная ангиография глазного дна (FFA)

Исследуемых животных разделяли на три когорты (10 животных/когорты). Лазерное повреждение индуцировали в день 0 с использованием четырех ожоговых пятен на глаз у 10 животных на группу.

В каждой из трех когорт, соответственно, следующие средства лечения вводили путем интравитреальной инъекции (ИВИ) в дни 8 и 16 после лазерной обработки, как указано далее:

Эйлеа + IgG агент, направленный против VEGF, эйлеа, и IgG (изотипический контроль) вводили путем интравитреальной инъекции (ИВИ), 3 инъекции через 1 неделю, 2 недели и 3 недели после лазерной обработки в объеме 1 мкл при 0,5 мкг.

Эйлеа + антитело к IL-11 (низкая дозировка) Комбинацию эйлеа и антитела к IL-11 (0,5 мкг в 1 мкл) вводили путем интравитреальной инъекции (ИВИ), 2 инъекции в день 8 и день 16 после лазерной обработки в объеме 1 мкл.

Эйлеа + антитело к IL-11 (высокая дозировка) Комбинацию эйлеа и антитела к IL-11 (2 мкг в 1 мкл) вводили путем интравитреальной инъекции (ИВИ), 2 инъекции в день 8 и день 16 после лазерной обработки в объеме 1 мкл.

Хориоидальную неоваскуляризацию (CNV) оценивали с использованием флуоресцентной ангиограммы глазного дна (FFA) после лазерного повреждения, но до начала лечения (день 7), и в конце терапии (день 28).

Флуоресцентную ангиографию глазного дна (FFA) визуализировали с использованием камеры для глазного дна MICRON IV (Phoenix Laboratories, США). Для FFA животным вводили путем внутривитреальной инъекции 10% флуоресцеин натрия в дозе 0,01 мл на 5-6 г массы тела.

Результаты FFA можно увидеть на Фигуре 2. Площадь протекания была ниже на день 28, чем на день 7 во всех трех группах лечения (Фигура 2a), однако этот эффект был более выраженным в группах комбинированной терапии эйлеа + антитело к IL-11. Кроме того, мы наблюдаем дозозависимый эффект антитела к IL-11 на уменьшение CNV в комбинации с эйлеа (Фигура 2b). Ко дню 28 во всех трех группах лечения наблюдали уменьшение протекания при лазерных повреждениях. Этот эффект был более выражен для группы эйлеа + антитело к IL-11 (низкая дозировка), чем для контрольного IgG, при этом для эйлеа + антитело к IL-11 (высокая дозировка) наблюдали самую высокую скорость заживления через 28 дней. На Фигурах 2a и 2b показан синергический эффект

антагонистического действия на опосредуемую IL-11 передачу сигнала и антагонистического действия на ангиогенный фактор в лечении CNV.

Структуру сетчатки также контролировали в реальном времени с помощью оптической когерентной томографии задней сегмента (PS-OCT) на день 7 после лазерного повреждения и день 28. Результаты можно увидеть на Фигуре 3, которые демонстрируют снижение хориоидальной неоваскуляризации в когортах комбинированной терапии дозозависимым образом.

Пример 3: Площадь фиброза

Площадь фиброза измеряли в конце лечения (день 28) для указанных выше животных путем гистопатологического исследования. Коллаген окрашивали с помощью трихромного окрашивания по Массону и количественно определяли площадь фиброза, результаты можно увидеть на Фигуре 4. Меньшую площадь фиброза наблюдали для когорт как с низкой дозировкой, так и с высокой дозировкой комбинированной терапии по сравнению с когортой эйлеа + контрольный IgG, при этом различия были статистически значимыми. В то время как когорта комбинированной терапии с низкой дозировкой показала меньшую площадь фиброза, чем когорта эйлеа + IgG, этот эффект был более выражен для когорты с высокой дозировкой. Таким образом, данные гистопатологии демонстрируют, что комбинированная терапия более эффективна, чем только монотерапия, и что этот эффект зависит от дозы.

Одновременно с этим выполняли иммунофлуоресцентное окрашивание, результаты которого можно увидеть на Фигурах 5 и 6, которые подтвердили наблюдения уменьшенной площади фиброза в когортах комбинированного лечения.

Пример 4: Сравнительное исследование

Животных разделяли на четыре когорты следующим образом:

- (i) Необработанные контроли
- (ii) Лечение эйлеа
- (iii) Лечение антителом к IL-11
- (iv) Лечение эйлеа + антителом к IL-11

Лазерное повреждение индуцировали в день 0 с использованием четырех ожоговых пятен на глаз у 10 животных на группу.

Животным вводили назначенное им лечение путем интравитреальной инъекции (ИВИ) в дни 8 и 16 после лазерной обработки.

Хориоидальную неоваскуляризацию (CNV) оценивали с использованием флуоресцентной ангиограммы глазного дна (FFA) после лазерного повреждения, но до

начала лечения (день 7), и в конце терапии (день 28). Площадь фиброза измеряли на день 28.

Результаты показали:

- Более низкую CNV и площадь фиброза на день 28 во всех когортах лечения по сравнению с контрольной когортой, не получившей лечение
- Более низкую CNV и площадь фиброза на день 28 в когорте, проходившей лечение эйлеа + антитело к IL-11, по сравнению с когортами монотерапевтического лечения
- Наблюдали синергический (т. е. сверхаддитивный) эффект, при этом улучшение CNV и площади фиброза в когорте, проходившей лечение эйлеа + антитело к IL-11, превышало сумму эффекта, наблюдаемого в когортах монотерапии, при объединении.

Резюме

Представленные в настоящей заявке результаты свидетельствуют о том, что терапия антагонистом IL-11 существенно снижает ретинальный фиброз (Фигура 3). Кроме того, противофиброзная терапия антагонистом IL-11, по-видимому, также оказывает благоприятный эффект на антиангиогенные свойства эйлеа (Фигура 2). Таким образом, очевидно, что противофиброзная терапия имеет синергический эффект с антиангиогенной терапией, о чем свидетельствует заметное улучшение как ретинального фиброза, так и хориоидальной неоваскуляризации в когортах комбинированной терапии по сравнению с когортами, получавшими противофиброзную монотерапию.

Литературные источники

1. Du, X. & Williams, D. A. Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use. *Blood* **89**, 3897–3908 (1997).
2. Hegner, B. *et al.* Intrinsic Deregulation of Vascular Smooth Muscle and Myofibroblast
5 Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *PLoS One* **11**, e0153101 (2016).
3. Guo, X. & Chen, S.-Y. Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation. *World J. Biol. Chem.* **3**, 41–52 (2012).
4. Hautmann, M. B., Madsen, C. S. & Owens, G. K. A Transforming Growth Factor β
10 (TGF β) Control Element Drives TGF β -induced Stimulation of Smooth Muscle α -Actin Gene Expression in Concert with Two CArG Elements. *J. Biol. Chem.* **272**, 10948–10956 (1997).
5. Ding, R., Darland, D. C., Parmacek, M. S. & D'Amore, P. A. Endothelial-mesenchymal interactions *in vitro* reveal molecular mechanisms of smooth muscle/pericyte differentiation. *Stem Cells Dev.* **13**, 509–520 (2004).
- 15 6. Taki, H. *et al.* Monokine stimulation of interleukin-11 production by human vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Atherosclerosis* **144**, 375–380 (1999).
7. Zimmerman, M. A. *et al.* Interleukin-11 attenuates human vascular smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H175–80 (2002).
8. Postlethwaite, Postlethwaite, Pattanaik, D. & Brown, M. Vascular involvement in
20 systemic sclerosis (scleroderma). *J. Inflamm. Res.* 105 (2011).
9. Matucci-Cerinic, M., Kahaleh, B. & Wigley, F. M. Review: Evidence That Systemic Sclerosis Is a Vascular Disease. *Arthritis & Rheumatism* **65**, 1953–1962 (2013).
10. Tudor, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I. & Flores, S. Pathology of pulmonary hypertension. *Clin. Chest Med.* **28**, 23–42, vii (2007).
- 25 11. Boin, F. *et al.* Oxidative stress-dependent activation of collagen synthesis is induced in human pulmonary smooth muscle cells by sera from patients with scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 123 (2014).
12. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **122**, 4306–4313 (2012).
- 30 13. Gordon, K. J. & Blobe, G. C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signalling pathways in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1782**, 197–228 (2008).
14. Crosas-Molist, E. *et al.* Vascular smooth muscle cell phenotypic changes in patients with Marfan syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 960–972 (2015).
15. Matt, P. *et al.* Circulating transforming growth factor-beta in Marfan syndrome.
35 *Circulation* **120**, 526–532 (2009).

16. Holm, T. M. *et al.* Noncanonical TGF β signalling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* **332**, 358–361 (2011).
17. Lindsay, M. E. & Dietz, H. C. Lessons on the pathogenesis of aneurysm from heritable conditions. *Nature* **473**, 308–316 (2011).
- 5 18. Dietz, H. C. 2006 Curt Stern Award Address. Marfan syndrome: from molecules to medicines. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 662–667 (2007).
19. Goumans, M.-J., Liu, Z. & ten Dijke, P. TGF- β signalling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res.* **19**, 116–127 (2009).
20. Starke, R. M. *et al.* Vascular smooth muscle cells in cerebral aneurysm pathogenesis.
10 *Transl. Stroke Res.* **5**, 338–346 (2014).
21. Nakajima, N., Nagahiro, S., Sano, T., Satomi, J. & Satoh, K. Phenotypic modulation of smooth muscle cells in human cerebral aneurysmal walls. *Acta Neuropathol.* **100**, 475–480 (2000).
22. Nikol, S. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1 is increased in human
15 vascular restenosis lesions. *J. Clin. Invest.* **90**, 1582–1592 (1992).
23. Nabel, E. G. *et al.* Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10759–10763 (1993).
24. Wolf, Y. G., Rasmussen, L. M. & Ruoslahti, E. Antibodies against transforming growth factor-beta 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J. Clin. Invest.* **93**, 1172–1178 (1994).
- 20 25. Edlin, R. S. *et al.* Characterization of primary and restenotic atherosclerotic plaque from the superficial femoral artery: Potential role of Smad3 in regulation of SMC proliferation. *J. Vasc. Surg.* **49**, 1289–1295 (2009).
26. Tsai, S. *et al.* TGF- β through Smad3 signalling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **297**, H540–9
25 (2009).
27. Mallawaarachchi, C. M., Weissberg, P. L. & Siow, R. C. M. Smad7 gene transfer attenuates adventitial cell migration and vascular remodeling after balloon injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1383–1387 (2005).
28. Louis, S. F. & Zahradka, P. Vascular smooth muscle cell motility: From migration to
30 invasion. *Exp. Clin. Cardiol.* **15**, e75–85 (2010).
29. Suwanabol, P. A., Kent, K. C. & Liu, B. TGF- β and restenosis revisited: a Smad link. *J. Surg. Res.* **167**, 287–297 (2011).
30. McCaffrey, T. A. *et al.* Genomic instability in the type II TGF- β 1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J. Clin. Invest.* **100**, 2182–2188 (1997).

31. Mallat, Z. *et al.* Inhibition of transforming growth factor-beta signalling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ. Res.* **89**, 930–934 (2001).
32. Robertson, A.-K. L. *et al.* Disruption of TGF- β signalling in T cells accelerates atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **112**, 1342–1350 (2003).
33. Grainger, D. J., Mosedale, D. E., Metcalfe, J. C. & Böttinger, E. P. Dietary fat and reduced levels of TGF β 1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 13)**, 2355–2361 (2000).
34. Grainger, D. J., Witchell, C. M. & Metcalfe, J. C. Tamoxifen elevates transforming growth factor-beta and suppresses diet-induced formation of lipid lesions in mouse aorta. *Nat. Med.* **1**, 1067–1073 (1995).
35. O'Connor, S. C. & Gornik, H. L. Recent developments in the understanding and management of fibromuscular dysplasia. *J. Am. Heart Assoc.* **3**, e001259 (2014).
36. Begelman, S. M. & Olin, J. W. Fibromuscular dysplasia. *Curr. Opin. Rheumatol.* **12**, 41–47 (2000).
37. Ganesh, S. K. *et al.* Clinical and biochemical profiles suggest fibromuscular dysplasia is a systemic disease with altered TGF- β expression and connective tissue features. *FASEB J.* **28**, 3313–3324 (2014).
38. Weber, B. R. & Dieter, R. S. Renal artery stenosis: epidemiology and treatment. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* **7**, 169–181 (2014).
39. El Mabrouk, M., Diep, Q. N., Benkirane, K., Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. SAM68: a downstream target of angiotensin II signalling in vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **286**, H1954–62 (2004).
40. Zhang, L. *et al.* Impaired peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells during hypertension. *J. Biol. Chem.* **285**, 13666–13677 (2010).
41. Warren, H. R. *et al.* Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. *Nat. Genet.* **49**, 403–415 (2017).
42. Cove-Smith, A. & Hendry, B. M. The regulation of mesangial cell proliferation. *Nephron Exp. Nephrol.* **108**, e74–9 (2008).
43. Diamond, J. R. & Karnovsky, M. J. Focal and segmental glomerulosclerosis: analogies to atherosclerosis. *Kidney Int.* **33**, 917–924 (1988).
44. Herrera, G. A. Plasticity of mesangial cells: a basis for understanding pathological alterations. *Ultrastruct. Pathol.* **30**, 471–479 (2006).

45. Loeffler, I. & Wolf, G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant* **29 Suppl 1**, i37–i45 (2014).
46. Santibanez, J. F., Krstic, J., Quintanilla, M. & Bernabeu, C. TGF- β Signalling and Its Role in Cancer Progression and Metastasis. in *eLS* 1–9 (2016).
- 5 47. Freyer, A. M., Johnson, S. R. & Hall, I. P. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**, 569–576 (2001).
48. Chung, K. F. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2**, 347–54; discussion 371–2 (2005).
- 10 49. Chen, G. & Khalil, N. TGF-beta1 increases proliferation of airway smooth muscle cells by phosphorylation of map kinases. *Respir. Res.* **7**, 2 (2006).
50. Ojiaku, C. A., Yoo, E. J. & Panettieri, R. A., Jr. Transforming Growth Factor β 1 Function in Airway Remodeling and Hyperresponsiveness. The Missing Link? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **56**, 432–442 (2017).
- 15 51. McMillan, S. J., Xanthou, G. & Lloyd, C. M. Manipulation of allergen-induced airway remodeling by treatment with anti-TGF-beta antibody: effect on the Smad signalling pathway. *J. Immunol.* **174**, 5774–5780 (2005).
52. Johnson, P. R. *et al.* Airway smooth muscle cell proliferation is increased in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **164**, 474–477 (2001).
- 20 53. Doeing, D. C. & Solway, J. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *J. Appl. Physiol.* **114**, 834–843 (2013).
54. Takizawa, H. *et al.* Increased Expression of Transforming Growth Factor- β 1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 1476–1483 (2001).
- 25 55. Stanzel, R. D. P., Lourenssen, S., Nair, D. G. & Blennerhassett, M. G. Mitogenic factors promoting intestinal smooth muscle cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C805–17 (2010).
56. Graham, M. F., Bryson, G. R. & Diegelmann, R. F. Transforming growth factor beta 1 selectively augments collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **99**, 447–453 (1990).
- 30 57. Zhang, H., Xiong, Z.-M. & Cao, K. Mechanisms controlling the smooth muscle cell death in progeria via down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, E2261–70 (2014).

58. Aliper, A. M. *et al.* Signalling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging* **7**, 26–37 (2015).
59. Bieri, B. *et al.* Abrogation of TGF-beta signalling enhances chemokine production and correlates with prognosis in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* **119**, 1571–1582 (2009).
60. Shull, M. M. *et al.* Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693–699 (1992).
61. GTEx Consortium. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**, 580–585 (2013).
62. Andersson, R. *et al.* An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* **507**, 455–461 (2014).
63. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. (2014). doi:10.1101/002832
64. Dams-Kozłowska, H. *et al.* A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine. *BMC Biotechnol.* **12**, 8 (2012).
65. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*. 438:946–953 (2005)
66. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol.* 2005;169:681–691.
67. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246:1306–1309. [PubMed]
68. Alon T, Hemo I, Itin A, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1995;1:1024–1028. [PubMed]

Формула изобретения

1. Способ лечения или предотвращения фиброза у субъекта, причем указанный способ включает введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора.
2. Комбинация антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора для применения в способе лечения или предотвращения фиброза.
3. Применение антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора при изготовлении лекарственного средства для применения в способе лечения или предотвращения фиброза.
4. Способ по п. 1, комбинация для применения по п. 2 или применение по п. 3, отличающиеся тем, что указанный фиброз представляет собой фиброз в глазу.
5. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-4, отличающиеся тем, что указанный фиброз выбран из офтальмопатии Грейва, эпиретинального фиброза, ретинального фиброза, идиопатического премакулярного фиброза, субретинального фиброза (например, ассоциированного с отслоением сетчатки или дегенерацией желтого пятна (например, влажной возрастной дегенерацией желтого пятна (AMD)), диабетической ретинопатии, глаукомы, географической атрофии, фиброза роговицы, послеоперационного фиброза (например, задней капсулы после операции по удалению катаракты или фильтрационной подушки после трабекулэктомии при глаукоме), конъюнктивального фиброза или субконъюнктивального фиброза.
6. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-5, отличающиеся тем, что указанный фиброз представляет собой ретинальный фиброз, эпиретинальный фиброз или субретинальный фиброз.
7. Способ по п. 1, комбинация для применения по п. 2 или применение по п. 3, отличающиеся тем, что указанный фиброз представляет собой фиброз сердца, фиброз печени или фиброз почки.
8. Способ, комбинация для применения или применение по п. 7, отличающиеся тем, что указанный фиброз локализован:
 - в печени и ассоциирован с хроническим заболеванием печени или циррозом печени;
 - в почке и ассоциирован с хроническим заболеванием почки; или

в сердце и ассоциирован с дисфункцией мышечной ткани или электрических свойств сердца или утолщением стенок или клапанов сердца.

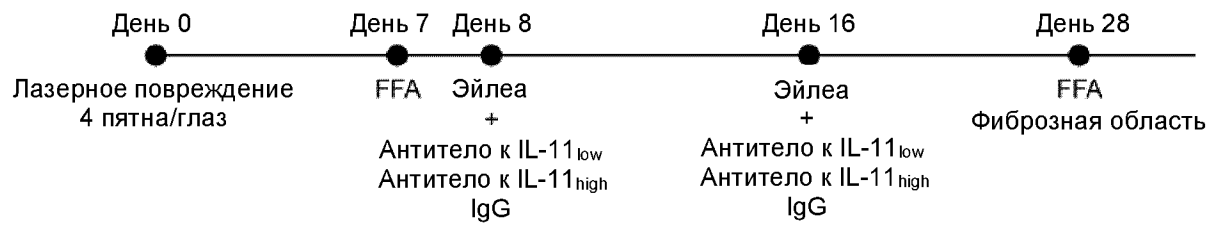
9. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-8, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор выбран из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF).
10. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-9, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор представляет собой VEGF.
- 10 11. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-10, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с рецептором IL-11.
12. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-11, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала
- 15 13. Способ, комбинация для применения или применение по п. 12, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
- 20 14. Способ, комбинация для применения или применение по п. 13, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой антитело к IL-11 или антитело к IL-11R α .
15. Способ, комбинация для применения или применение по п. 13, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой
- 25 16. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-10, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала способен уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.
17. Способ, комбинация для применения или применение по п. 16, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
- 30

18. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-17, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
- 5 19. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-18, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
20. Способ, комбинация для применения или применение по п. 19, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
- 10 21. Способ, комбинация для применения или применение по п. 20, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой антитело к VEGF или антитело к рецептору VEGF.
- 15 22. Способ, комбинация для применения или применение по п. 20, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку VEGF.
23. Способ, комбинация для применения или применение по п. 22, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой афлиберцепт.
- 20 24. Способ, комбинация для применения или применение по любому из пп. 1-17, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора способен уменьшать экспрессию ангиогенного фактора или партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.
- 25 25. Способ, комбинация для применения или применение по п. 24, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
26. Комбинация, содержащая антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора.
- 30 27. Фармацевтическая композиция, содержащая антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагонист ангиогенного фактора.

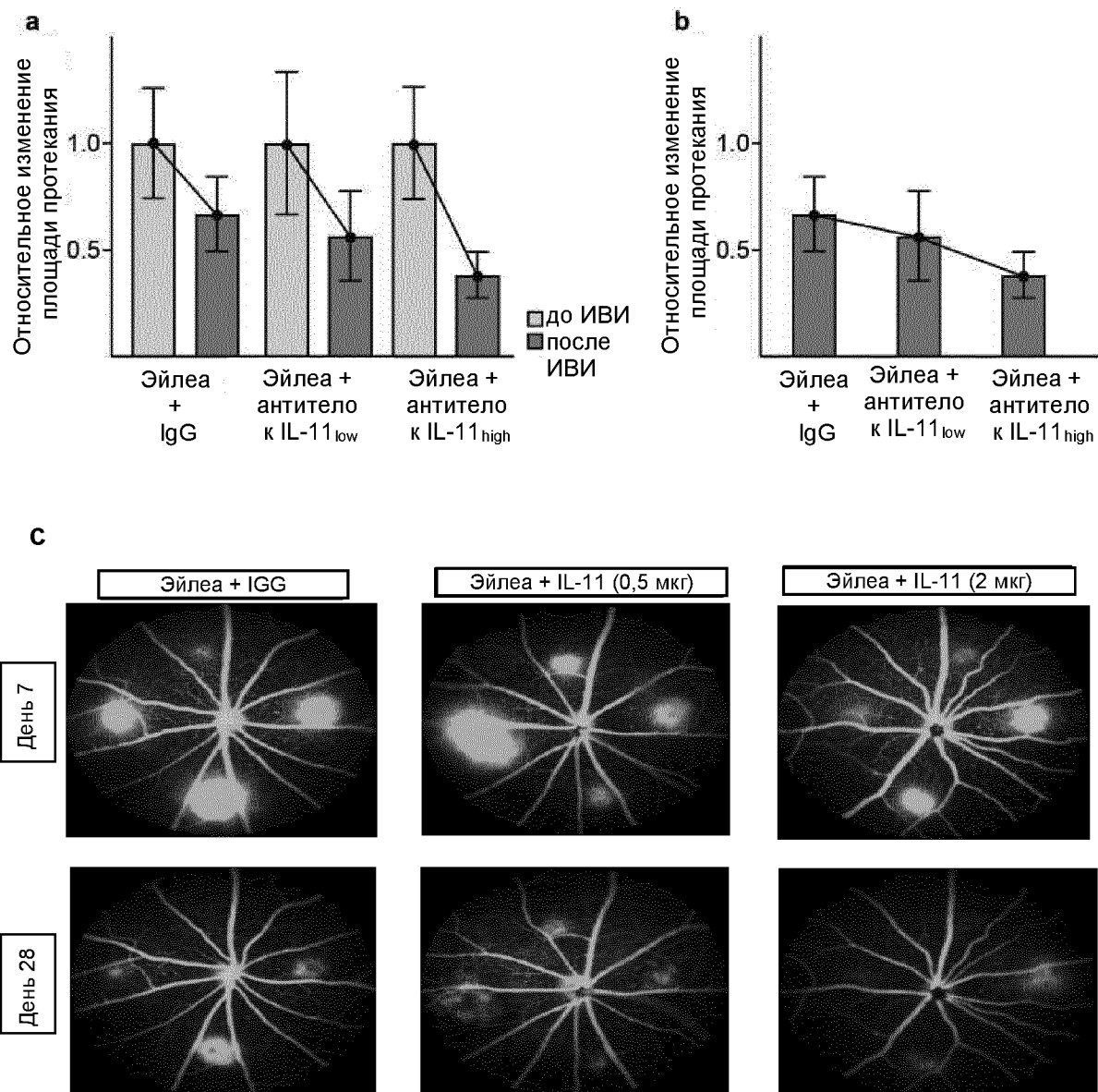
28. Набор компонентов, содержащий заранее определенное количество антагониста опосредуемой IL-11 передачи сигнала и антагониста ангиогенного фактора, комбинации по п. 26 или фармацевтической композиции по п. 27.
29. Комбинация по п. 26, фармацевтическая композиция по п. 27 или набор
5 компонентов по п. 28, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор выбран из фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста фибробластов (FGF) и тромбоцитарного фактора роста (PDGF).
30. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из
10 пп. 26-29, отличающиеся тем, что указанный ангиогенный фактор представляет собой VEGF.
31. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-30, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание IL-11 с рецептором IL-11.
- 15 32. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-31, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой агент, способный связываться с IL-11 или рецептором IL-11.
33. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 32, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала
20 выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
34. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 33, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой антитело к IL-11 или антитело к IL-11R α .
- 25 35. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 33, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой рецептор-ловушку IL-11.
36. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из
30 пп. 26-30, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала способен уменьшать экспрессию IL-11 или рецептора IL-11.

37. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 36, отличающиеся тем, что указанный антагонист опосредуемой IL-11 передачи сигнала представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.
38. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-37, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный предотвращать или уменьшать связывание ангиогенного фактора с партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
39. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-38, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой агент, способный связываться с ангиогенным фактором или партнером по взаимодействию для ангиогенного фактора.
40. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 39, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора выбран из группы, состоящей из: антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, полипептида, пептида, олигонуклеотида, аптамера или малой молекулы.
41. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 40, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой антитело к VEGF или антитело к рецептору VEGF.
42. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 40, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой рецептор-ловушку VEGF.
43. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 42, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой афлиберцепт.
44. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по любому из пп. 26-37, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора способен уменьшать экспрессию партнера по взаимодействию для ангиогенного фактора.
45. Комбинация, фармацевтическая композиция или набор компонентов по п. 44, отличающиеся тем, что указанный антагонист ангиогенного фактора представляет собой олигонуклеотид или малую молекулу.

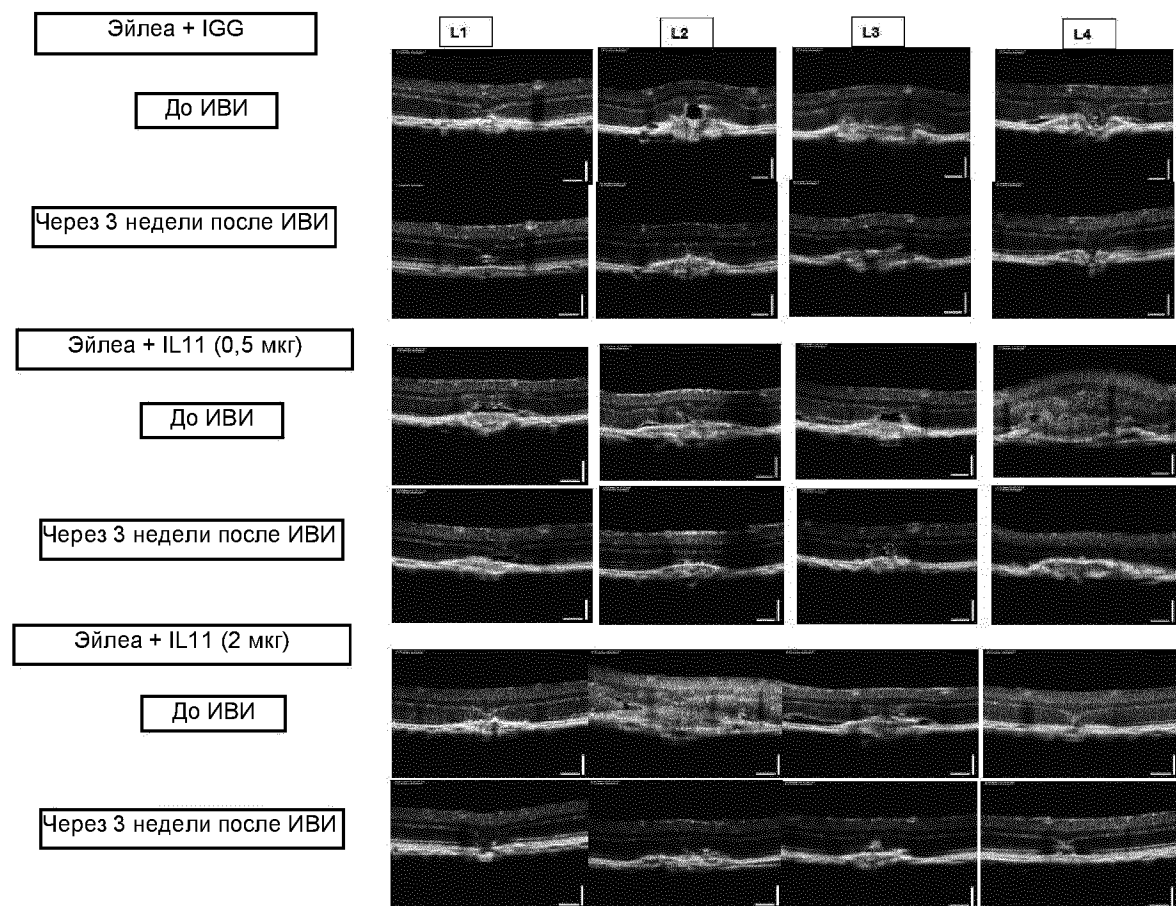
ФИГУРА 1



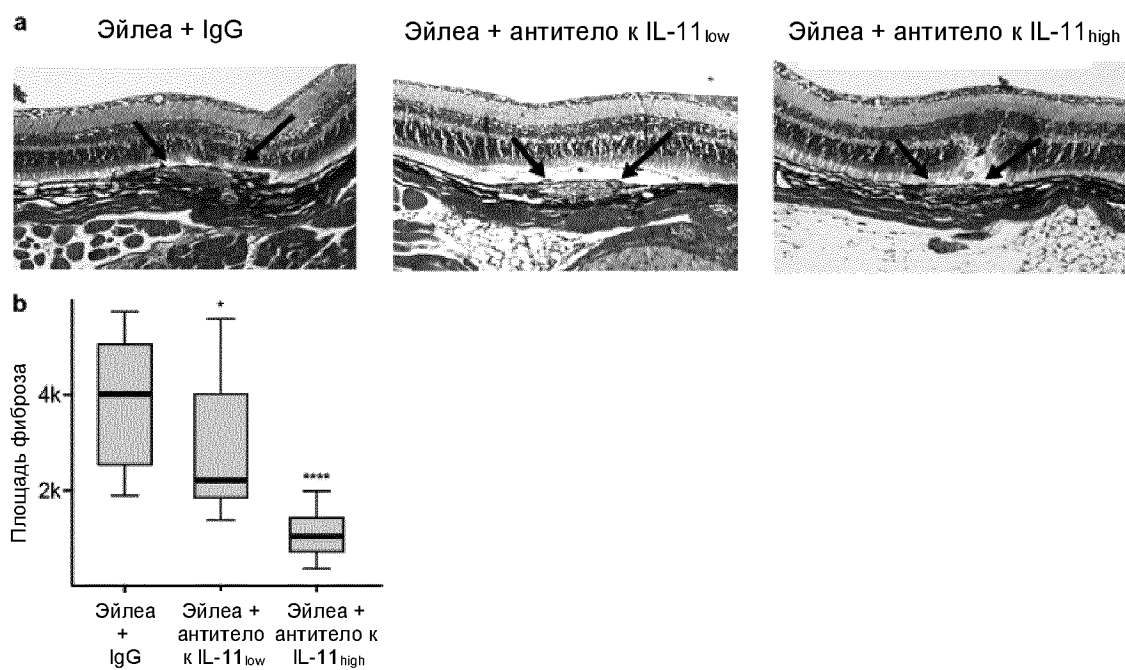
ФИГУРА 2



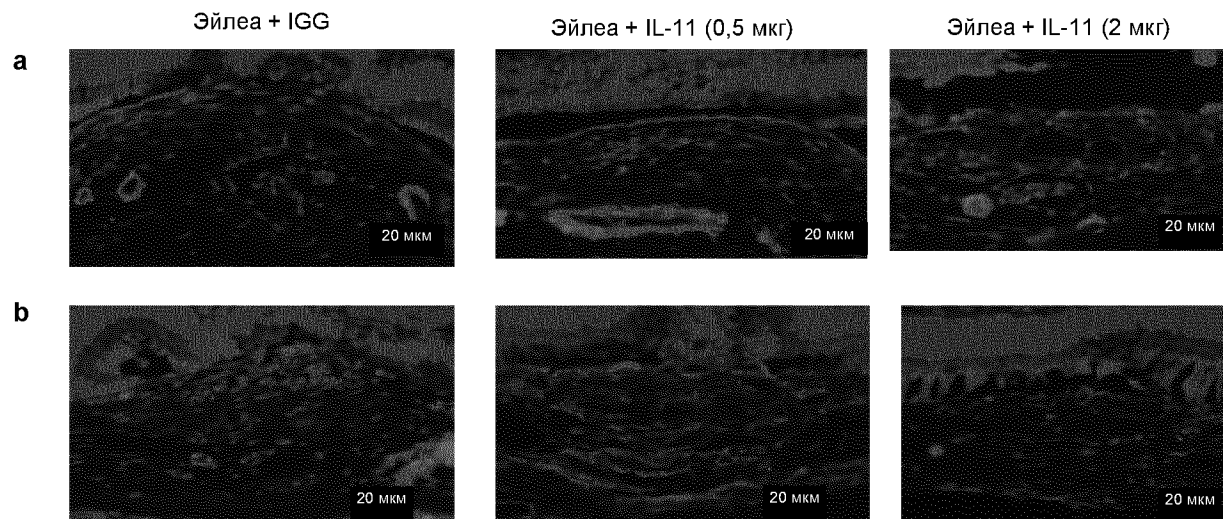
ФИГУРА 3



ФИГУРА 4



ФИГУРА 5



ФИГУРА 6

